

Thèse présentée par

Flavie ROBERT

Pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg

Sciences du Vivant – Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**TRRAP, une protéine plateforme :
Fonction d'un co-facteur de l'acétylation des histones
dans la réparation des cassures double brin de l'ADN.**

Soutenue publiquement le 15 juin 2005

JURY :

Directeur de Thèse : **Dr László Tora**, IGBMC, Illkirch
Rapporteur interne : **Dr Gilbert De Murcia**, ESBS, Illkirch
Rapporteur externe : **Dr Annick Harel-Bellan**, Institut A Lwoff, Villejuif
Rapporteur externe : **Dr Zhao-Qi Wang**, IACR, Lyon
Examineur : **Pr Stéphane Viville**, IGBMC, Illkirch

AVANT PROPOS

Ce manuscrit sera divisé en **trois parties distinctes**, les deux premières portant sur les axes principaux de mon travail, et la dernière sur des études en collaboration.

La première partie décrit l'étude de la protéine **TRRAP, et de sa fonction dans la réparation des cassures double brin de l'ADN**. Dans un souci de clarté, l'introduction, les résultats et la discussion ont été regroupés. Les résultats expérimentaux comprennent un manuscrit de publication soumis récemment, et actuellement en révision.

La deuxième partie est consacrée à la **caractérisation d'une modification post-traductionnelle d'histone spécifique de la mitose**. De même que pour la première partie, une courte introduction précède les données expérimentales et la discussion. Cette étude représente une part mineure de mon travail, et une étape seulement d'un projet plus large mené au laboratoire du Dr TORA par Adrien Eberlin. Malgré cela, j'ai souhaité l'inclure à ce manuscrit car elle a nécessité la mise en œuvre d'une démarche analytique originale, basée sur l'utilisation raisonnée de la spectrométrie de masse.

Enfin, la dernière partie présente deux publications auxquelles j'ai participé, dans le cadre de **collaborations** avec des équipes indépendantes. Toutes deux restent dans la thématique historique du laboratoire du Dr TORA, qui est l'étude des mécanismes de régulation de l'expression des gènes codant pour des protéines.

Merci !

Mes premiers remerciements vont aux Dr Harel-Bellan, De Murcia, et Wang, et au Pr Viville, qui ont acceptés de juger mon travail et pris la peine de lire ce manuscrit.

Je remercie Le CNRS et la Région Alsace pour avoir supporter financièrement mon travail pendant 3 ans.

Je dois un grand remerciement au Dr Laszlo TORA, pour le temps consacré à accompagner mes premiers pas en biologie, et surtout pour avoir fait un pari risqué, il y a 4 ans, en m'accueillant dans son laboratoire. J'ai beaucoup apprécié sa disponibilité et ses qualités humaines autant que scientifiques.

La première personne qui m'ait réellement parlé de recherche est le Dr Alain Van Dorsselaer. Il m'en a donné le goût et la méthode, je lui en suis toujours reconnaissante.

Cette thèse n'aurait pas été un plaisir sans quelques personnes formidables :

Merci Sara, pour avoir été un binôme agréable et efficace, pour les bons moments de sciences et les bons moments d'amitié : sans toi, je confondrai encore les introns et les exons, les orthologues et les paralogues... et je serai passer à coté de Murakami et JK Toole !

Je remercie sincèrement Manuela, à qui je dois un entretien avec le Pr Chambon un jour de novembre 2001 ! Et cette complicité autour d'un MALDI qui nous a permis des discussions très intéressantes.

Merci Eli pour ta disponibilité sans pareil, pour les touches de légèreté dans une journée grisouille... et les bredele de Noël... et encore plein de choses !

Merci Maté, (you'll say you don't deserve it but it's false !) parce que j'ai pu parler régulièrement anglais grâce à toi et parce que tu as été d'une grande efficacité pour me tirer un sourire les jours de manip foireuse ! Et enfin, Deus ex machina, Köszönöm Neked a Sainte Hélène 13 szám alatt töltött estét. Don't give up !

Merci Adrien (pour tout le matériel que tu m'as régulièrement fourni dans le projet 2H12, et pour avoir accepté de discuter avec une « téléphobe » comme moi), Laure (tant d'humour caustique dans une petite personne : te laisse pas faire par les affreux de 4016), Traci (for the « genuine american cookies » recipe, and for committed political discussions before W second mandate), Mattia (les morceaux de glace dans le dos, aïe !, mais aussi tous ces merveilleux petits trucs, coups de main, gracie !), Zita (Cher ange, je promets de tenter la cuisine hongroise). Emese (un rire si communicatif, et une franchise sans pareil), et Antoinette (Un jour j'irai au Liban).

Merci aussi à Philippe KK (on aurait pu s'échanger nos chapitres de thèse, mais on l'a pas fait !) Merci aux anciens du labo, Claire, Bill, Brendan, Elmar, et Sonja (sans qui je ne saurais même pas faire un WB). Et au nouveau (Bienvenu Didier !). Aux personnes rencontrées au hasard des couloirs...Un sourire, trois mots... Merci pour cela aussi, Florence, Marielle, Gabrielle, Raphaella, Aurélie, Annass, Konstantin, Gaëtan, Nathalie, Irene, Philippe C, Nicolas C, Marie C, Fabrice, Hélène, Dominique H...(et j'en oublie sûrement, qu'ils m'excusent).

Je remercie enfin l'équipe de Dora Papadopoulo, et plus particulièrement Céline J et Céline B qui ont permis à Sara et moi de débiter un projet ardu. Sarah S, Chrystel, Sophie, François, Elsa, Christine C, et Jean Marc du LSMBO ont toujours été disponibles, pour un coup de main ou un conseil, un grand Merci !

Beaucoup de choses n'auraient pas été possibles sans la contribution des services communs de l'IGBMC : Pascal Eberlin au service peptides, Mustapha pour les anticorps monoclonaux, Isabelle et Jean Luc au service baculovirus, Didier et M Vonesh au service microscopie, Claudine et Jochen au service de tri cellulaire, Mais aussi Maïté, Doris, Hélène, Evelyne, et l'ensemble du personnel du secrétariat.

Pour finir, M. JM Fétrot m'a encadré au printemps 2005 dans le protocole de Valorisation de Compétences de l'Ecole Doctorale : je souhaite le remercier sincèrement pour sa disponibilité et pour la confiance en moi qu'il m'a apportée ces derniers mois.

Et parce qu'il y a une vie hors du labo :

Charlotte, Nicolas, Caroline, Renaud, Katy, Sandra, Anne, Régis, Merci pour votre amitié de longue date, en souvenir de soirées ECPM (et des après soirées aussi), en souvenir des Artefacts 2004, trop d'la Balle !! Sur ces quatres années vous avez aussi été là quand j'ai eu besoin d'aide, c'est précieux les potes !

Emilie, merci de ne pas être comme tout le monde, ton esprit large et tes envies de penser plus loin m'ont souvent rassurée sur le monde de la Recherche... J'espère qu'on se retrouvera quand tu philosopheras et que j'écologiserai. Et merci pour le coup de main de ces derniers mois !

Adrien D, merci, merci, je crois que tu sais pourquoi. Ne te décourage pas, la perle existe, tu la trouveras au moment le plus inattendu.

Marie, Thomas D., Vincent V, Aurore, Francesca, et tous les passants de l'auberge St Gothard, merci pour les bonnes soirées, les couchers de soleil sur le balcon, à refaire le monde (special thanks to MDJI !).

François-Xavier, Sandrine, Alex N, on est plus vraiment des souris, mais on reste des amis ?

Merci Jean Marc, parce que « On reconnaît quelqu'un d'intelligent à son sourire » et parce que « Tout sujet est digne de curiosité ». Mais je ferai quand même pas l'ENA !!

Marie-Françoise, maman, grâce à toi une petite fille est devenue une grande fille... mais des fois tu lui manques encore.

Emmanuel et Camille merci, simplement parce que vous êtes là. J'en reviens pas que vous soyez déjà si grands.

« You, and the night, and the music... »

Les mots ici ne diront pas tout. Thomas, merci de tout mon cœur.

SOMMAIRE

AVANT PROPOS	2
ABBREVIATIONS ET ACRONYMES.....	9
LISTE DES FIGURES	11
PARTIE I.....	13
FONCTION DU CO-FACTEUR D'ACÉTYLATION TRRAP DANS LA RÉPARATION DES CASSURES DOUBLE BRIN DE L'ADN.....	13
INTRODUCTION CHAPITRE 1 :	14
INITIATION DE LA TRANSCRIPTION DE L'ADN	14
I. DE L'ADN À LA PROTÉINE :	14
a. <i>L'ensemble des étapes</i>	14
b. <i>L'initiation de la transcription est une étape fondamentale de régulation de l'expression génique.</i>	14
II. RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION PAR LES SÉQUENCES D'ADN ENTOURANT LE GÈNE.....	15
a. <i>Le promoteur minimal</i>	15
i. La boîte « TATA »	15
ii. Le site d'initiation Inr.....	17
iii. Le site de reconnaissance de TFIIB ou BRE	17
iv. Le site de régulation en aval ou DPE	17
b. <i>Séquences régulatrices distales</i>	18
III. ACTEURS DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION.....	18
a. <i>L'ARN polymérase II</i>	19
i. Les ARN polymérases, évolution et conservation.....	19
ii. L'ARN polymérase II	19
b. <i>Facteurs généraux de la transcription</i> :	22
i. TBP et ses homologues	22
ii. TFIID et les TAFs	23
iii. TFIIA	27
iv. TFIIB	27
v. TFIIF	27
vi. TFIIE	28
vii. TFIIH :	28
viii. L'assemblage du PIC et la ré-initiation de la transcription.	30
ix. De l'initiation de la transcription à l'élongation :	30
c. <i>Co-facteurs de la transcription</i>	31
i. Introduction :	31
ii. Les TAFs	31
iii. Le complexe médiateur.....	33
iv. Enzymes de modifications post-transcriptionnelles.....	35
v. Les complexes de remodelages de la chromatine dépendant de l'ATP.....	35
vi. Les répresseurs de la transcription :	37
vii. Un exemple d'intégration du signal et de régulation de l'expression génétique : la transcription soumise aux récepteurs nucléaires.....	38
INTRODUCTION CHAPITRE 2 :	39
LES COMPLEXES « HISTONES ACÉTYLTRANSFÉRASES ».....	39
I. LES ENZYMES HISTONE ACÉTYLTRANSFERASE (HAT) :	39
a. <i>Enzymes cytoplasmiques</i> :	39
b. <i>Enzymes nucléaires</i> :	39
i. Famille GNAT	41
ii. Famille Myst :	43

iii.	Autres :	47
II.	LES COMPLEXES GNAT OU SAGA-LIKE : SAGA, SLIK, PCAF, STAGA, TFTC	48
a.	<i>Une base structurale commune</i>	50
i.	Les familles de sous-unités conservées :	50
ii.	Une structure commune	54
b.	<i>Données spécifiques aux complexes de levure</i>	55
i.	sous-unités connues uniquement chez SAGA/SLIK	55
ii.	Particularité de SLIK	56
iii.	Conclusion	57
c.	<i>Conservation fonctionnelle de TFTC/PCAF/STAGA</i>	57
d.	<i>Sont ils les mêmes ?</i>	58
e.	<i>SAGA/TFTC versus TFIID : quelle fonction particulière dans la régulation de la transcription ?</i>	61
III.	LE COMPLEXE NUA4/TIP60	63
a.	<i>Composition</i>	63
b.	<i>Conservation</i>	66
c.	<i>Une étonnante richesse de complexes semblables</i>	66
d.	<i>Fonctions</i>	67
i.	Activités enzymatiques	67
ii.	Activation de la transcription	67
iii.	Contrôle épigénétique de l'expression des gènes	68
iv.	NuA4/TIP60 et la réparation des lésions de l'ADN	69
e.	<i>Conclusion</i>	69
	INTRODUCTION CHAPITRE 3 :	72
	TRRAP :	72
I.	CONSERVATION PHYLOGÉNÉTIQUE ET STRUCTURE	72
a.	<i>Domaines et motifs caractéristiques de la famille TRRAP</i>	72
II.	FONCTION DE CO-ACTIVATION DE LA TRANSCRIPTION	74
a.	<i>Co-activation soumise aux activateurs acides</i>	74
b.	<i>Co-activation soumise aux oncogènes et suppresseur de tumeurs</i>	75
i.	Différents activateurs interagissent avec TRRAP	75
ii.	Redondance avec Tip49	77
c.	<i>Co-activation soumise aux récepteurs nucléaires</i>	77
d.	<i>E1A séquestre TRRAP pour transformer les cellules</i>	78
e.	<i>Un mécanisme commun de trans-activation ?</i>	79
III.	DONNÉES DE DÉLÉTION IN VIVO DU GÈNE TRRAP :	81
IV.	CONCLUSION :	83
	INTRODUCTION CHAPITRE 4 :	85
	REPARATION DES CASSURES DOUBLE-BRIN DE L'ADN	85
I.	INTRODUCTION : L'IMPORTANCE DE MAINTENIR L'INTÉGRITÉ DU GÉNOME	85
II.	LES CAUSES DE CASSURES DOUBLE BRIN DE L'ADN : RÔLE BIOLOGIQUE ET CARACTÈRE PATHOGÈNE	85
a.	<i>Les causes exogènes</i>	85
b.	<i>Les causes endogènes</i>	86
i.	Recombinaison des chromosomes homologues durant la méiose :	86
ii.	Variabilité des gènes d'immunoglobuline :	88
iii.	Commutation du signe de conversion (type sexuel) chez la levure :	88
III.	DÉTECTER ET RÉPARER LES DSB	88
a.	<i>Détection</i>	88
b.	<i>Réparation</i>	89
i.	Organisation spatiale de la réparation	89
ii.	Les différents mécanismes de réparation des DSB	91
c.	<i>MRN, intervenant multifonction de la réparation DSB</i>	96
i.	sous-unités et leurs fonctions enzymatiques :	96
ii.	Structure du complexe	100
iii.	Quels rôles pour MRN dans le processus de DSB ?	102
IV.	DIALOGUE ENTRE LA MACHINERIE DE RÉPARATION ET LES AUTRES PROCESSUS TOUCHANT L'ADN	103
a.	<i>Signalisation des DSB aux points de contrôle du cycle cellulaire</i>	104

i.	La famille PIKK.....	104
ii.	L'activation des points de contrôle.....	105
iii.	Choix entre réparation et apoptose.....	105
b.	Organisation de la chromatine et réparation des DSB.....	105
c.	Transcription et réparation des DSB.....	107
d.	Réplication et réparation des DSB.....	108
PARTIE I : RÉSULTATS : PUBLICATION.....		109
PARTIE I : RÉSULTATS NON PUBLIÉS :.....		111
I.	ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE DES PARTENAIRES DE TRRAP INDÉPENDANT DE TFTC.....	111
a.	Les sous-unités de SWI/SNF :.....	111
b.	TRRAP dans le complexe TIP60 :.....	113
c.	Co-facteurs de transcription, suppresseurs de tumeur et oncogènes :.....	113
d.	Facteurs liés à la réparation ou à la condensation de l'ADN :.....	113
e.	sous-unités de TFTC ?.....	113
f.	Conclusion.....	114
II.	ÉTUDES BIOCHIMIQUES DU CO-FACTEUR DE LA TRANSCRIPTION TRRAP DANS LA RÉPARATION DES CASSURES DOUBLE BRIN DE L'ADN :.....	114
a.	En cas de DSB, TRRAP est elle plus exprimée et quantitativement plus associée à MRN ?.....	114
b.	TRRAP influence-t'elle l'état de phosphorylation de NBS1 et H2AX, et l'expression de facteurs d réparation, en cas de traitement génotoxique ?.....	116
c.	TRRAP est elle relocalisé dans des les foyers de réparation des DSB comme d'autres facteurs de réparation ?.....	117
d.	Les complexes MRN et TRRAP-MRN reconstitués ont ils la capacité de réparer l'ADN par end-joining in vitro ?.....	119
PARTIE I : DISCUSSION.....		122
I.	TRRAP ET LA RÉPARATION DSB.....	122
a.	Par homologie avec la transcription :.....	124
i.	Hypothèse 1.....	124
ii.	Hypothèse 2.....	126
iii.	Modèle.....	126
iv.	TRRAP et la recombinaison homologue.....	127
b.	Inter-connection avec les points de contrôle du cycle cellulaire :.....	127
II.	MODULARITÉ DES COMPLEXES MULTI-PROTÉIQUES.....	129
III.	CONCLUSION :.....	130
PARTIE II.....		132
ANALYSE DE L'HISTONE H3 SOUS UNE FORME SPÉCIFIQUE AUX CHROMOSOMES MITOTIQUES		132
I. INTRODUCTION.....		134
A.	MODIFICATION DES QUEUES AMINO-TERMINALES DES HISTONES.....	134
i.	Les queues amino-terminales d'histone sont des cibles privilégiées d'interaction et de modification.....	134
ii.	Types de modifications et motifs de reconnaissance.....	135
1.	De nombreux résidus modifiables :.....	135
2.	Domaines reconnaissant les modifications des histones.....	135
B.	LE CODE HISTONE : DIALOGUE ENTRE MODIFICATIONS VIA LES CO-FACTEURS DE LA TRANSCRIPTION.....	136
i.	Les hypothèses :.....	136
ii.	Communication en cis et trans entre les modifications.....	136
iii.	L'initiation de la transcription et le code histone.....	137
iv.	La mémoire cellulaire et le code histone.....	137
v.	Un rôle pour les adétylations dans la mémoire cellulaire ?.....	138
C.	LE CODE HISTONE DURANT LA MITOSE.....	141
IV. RÉSULTATS.....		144
A.	HISTORIQUE DU PROJET :.....	144
B.	IDENTIFICATION DE L'HISTONE H3 COMME ANTIGÈNE DE L'ANTICORPS 2H12.....	144

C.	ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE SIMPLE	146
D.	ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE TANDEM.....	148
V.	DISCUSSION	152
A.	STABILITÉ DE LA DIMÉTHYLATION DE LA LYSINE K9 DURANT LA MITOSE :	152
B.	L'ANTICORPS 2H12 RECONNAÎT-IL AUSSI LA SÉRINE 10 PHOSORYLÉE SUR H3 ?	152
C.	PERSPECTIVES :	153
PARTIE III.....	156
COLLABORATIONS	156
I.	IDENTIFICATION D'UN PARALOGUE HUMAIN D'ADA2, ACTIF DANS LA RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION DÉPENDANTE DE GCN5 ET BRG1.	157
II.	ETUDE DU RECRUTEMENT DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SUR LE PROMOTEUR HSP70 DE DROSOPHILE, EN RELATION AVEC SON ACTIVATION.	158
MATERIEL ET METHODES :	160
I.	<i>Biologie moléculaire et cellulaire:</i>	160
I.	<i>Concentration, purification d'échantillons et analyse par spectrométrie de masse :</i>	164
ANNEXES	169
	<i>ANNEXE 1 : Schéma de fragmentation du peptide KSTGGKAPR.....</i>	<i>169</i>
	<i>ANNEXE 2 : Principe de fragmentation peptidique en MS tandem.</i>	<i>171</i>
	<i>ANNEXE 3</i>	<i>173</i>
	<i>Stratégie analytique appliquée à l'identification et la caractérisation de protéines par spectrométrie de masse.</i>	<i>173</i>
BIBLIOGRAPHIE.....	180

ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

ADN : Acide Desoxyribonucléique
AR : Androgen Receptor
ARN : Acide Ribonucléique
ARN pol II : ARN polymérase II
AT : Ataxia Telangiectasia
ATLD : Ataxia Telangiectasia Like Disorder
ATM : Ataxia Telangiectasia mutated
ATP : Adenosine Triphosphate
ATR : ATM and Rad3 related
bp : bases pair
BRCA : BReast Cancer Activated protein
BRE : TFIIB Recognition Element
CBP : CREB Binding Protein
CDK : Cyclin Dependent Kinase
CHCA : alpha-cyano 4-hydroxycinnamic acid
CTD : Carboxy-Terminal Domain
DHB : DiHydroxyBenzoïque acid
DNAPK : DNA Dependent Protein Kinase
DPE : Downstream Promoter Element
DSB : Double Strand Break
ER : Estrogen receptor
ESI : ElectroSpray Ionisation
Extemp : Extemporément
yGCN5 : General Control of amiNo acid synthesis protein
GTF : General Transcription Factor
HAT : Histone AceTyltransferase
HDAC : Histone DeACetylase
HFD : Histone Fold Domain
HMT : Histone MethylTransferase
HR : Homologous Recombination
hs : Homo sapiens
Inr : site d'initiation
IP : Immunoprecipitation
IT : Ionisation Trap
Kb : Kilobase
Kd : Kilodalton
KO : Knock Out
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
Mda : Mégadalton
Med : Médiateur complex
MMS : MethylMethane Sulfonate
MRN : MRE11-RAD50-NBS1 complex
MRE11 : Meiotic Recombination protéin 11
MPT : Modification Post-Traductionnelle
NBS1 : Nijmegen breakage syndrome 1
NHEJ : Non Homologous End Joining
NR : Nuclear Receptor
PARP : Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PBS : Phosphate Buffer Saline
PIC : Pre-Initiation Complex
PPAR : Peroxisome Proliférateur-Activated Receptor
RT : Room Temperature
RAR : Retinoid Acid Receptor
RFC : Replication Factor C
RXR : Retinoid X Receptor

Sc : *Saccharomyces cerevisiae*
siRNA : small interfering RNA
Sp : *Saccharomyces pombe*
SSA : Single Strand Annealing
SPT : SuPressor of Ty
TBP : TATA Binding Protein
Tip60 : TAT interaction protein
TOF : Time Of Flight
Tra1 : Transactivation/transformation domain associated protein de levure
TRRAP : TRansactivation/tRansformation domain Associated Protein de *Homo sapiens*
trrap : transactivation/transformation domain associated protein de *Mus musculus*
trrap : gène de TRRAP ou trap
USA : Upstream Activating Sequence
VDR : Vitamin D receptor
WB : western blot

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du promoteur et séquences régulatrices	16
Figure 2 : Structure de l'ARN polymérase II	20
Figure 3 : Structure tridimensionnelle de TFIID et localisation des TAFs	26
Figure 4 : Assemblage du complexe de pré-initiation (PIC).....	29
Figure 5 : Complexes ATPases de remodelage de la chromatine	34
Figure 6 : Enzymes HAT de la famille GNAT	41
Figure 7 : Enzymes HAT de la famille MYST	43
Figure 8 : Complexes comprenant des TAFs	51
Figure 9 : Structures des complexes SAGA et TFTC	55
Figure 10 : Ressemblance structurale de TFTC et TFIID	62
Figure 11 : Complexes NuA4/TIP60 et ATPases proches	64
Figure 12 : Organisation de la protéine TRRAP.....	74
Figure 13 : Modélisation de l'ouverture d'un promoteur coordonnée par TRRAP.....	84-86
Figure 14 : Réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN	91
Figure 15 : Processus de réparation par NHEJ.....	94
Figure 16 : Processus de réparation par HR	97
Figure 17 : Processus de réparation par SSA	99
Figure 18 : Organisation de Mre11, rad50, Nbs1 et Xrs2	101
Figure 19 : Structures supposées de MRN	103
Figure 20 : Rôle structural de MRN dans la réparation des DSB	105
Figure 21 : Résultats d'analyse MS pour l'étude TRRAP	120
Figure 22 : Expressions de facteurs de réparation en fonction de TRRAP.....	123
Figure 23 : Localisation de TRRAP après irradiation <i>in vivo</i>	126
Figure 24 : Activité NHEJ de MRN et TRRAP-MRN <i>in vitro</i>	128
Figure 25 : Rôle direct de TRRAP dans la réparation des DSB.....	131-133
Figure 26 : Rôle de TRRAP dans la signalisation des DSB.....	136
Figure 27 : Modifications covalentes des histones.....	142
Figure 28 : Modifications des histones durant la division cellulaire	149
Figure 29 : Marquage par l'anticorps 2H12 de cellules mitotiques.....	152
Figure 30 : Séparation sur gels d'échantillons d'IP-2H12 pour l'analyse MS	154
Figure 31 : Identification MS du peptide diméthylé reconnu par 2H12.....	156
Figure 32 : Séquençage MS/MS du peptide diméthylé reconnu par 2H12.....	158
Figure 33 : Test d'affinité de l'anticorps 2H12 pour différents peptides	160
Annexe 1 :	179
Annexe 2 :	181
Annexe 3 :	184

PARTIE I

***FONCTION DU CO-FACTEUR D'ACÉTYLATION TRRAP DANS LA
REPARATION DES CASSURES DOUBLE BRIN DE L'ADN***

INTRODUCTION CHAPITRE 1 :

INITIATION DE LA TRANSCRIPTION DE L'ADN

I. De l'ADN à la protéine :

a. L'ensemble des étapes

Les chromosomes de chaque cellule portent une information génétique qui doit être traduite en acteurs, c'est-à-dire en protéines. Celles-ci assurent alors des fonctions enzymatiques, motrices, architecturales, de communication ou encore de transport au sein de la cellule. Ce chemin fondamental de l'ADN à la protéine se décompose en plusieurs étapes : la transcription de l'ADN en ARN pré-messager, l'épissage de celui-ci en ARN messenger, et dans le cytoplasme, la traduction de l'ARN messenger en protéine par le ribosome. Pour devenir active, une protéine doit encore adopter une structure tridimensionnelle, souvent à l'aide de chaperons. La vie d'une protéine se termine enfin par sa dégradation par le protéasome, qui sépare les acides aminés et permet leur réutilisation.

L'ARN polymérase II (ARN pol II), spécialisée dans la synthèse d'ARN pré-messager codant pour des protéines, parcourt le gène de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Elle synthétise un ARN simple brin en catalysant la formation de liaisons phosphodiester entre nucléotides appariées à l'ADN modèle. L'ARN néo-synthétisé doit être immédiatement protégé de la dégradation. À cette fin, son extrémité 5' est rapidement « coiffée » d'un nucléotide G méthylé. Quand l'ARN pol II produit une séquence AAUAAA, la fin de la synthèse est déclenchée, et l'ARN est clivé. Une chaîne de 100 à 200 résidus d'acide adénylique est immédiatement additionnée à son extrémité 3' par une polymérase spécialisée (poly-A polymérase).

Seule une fraction de cet ARN messenger primaire correspond à la séquence d'acides aminés de la protéine, comme cela a été montré de façon inattendue en 1979 (*Crick, 1979*). Les parties non codantes, dites introns, sont donc éliminées lors de l'épissage. Par un mécanisme complexe, et encore obscur aujourd'hui, les introns sont excisés à une extrémité, fermés en lasso puis libérés des exons qui sont dans le même temps ligaturés. Ces réactions sont assurées par le complexe d'épissage au sein du noyau. La régulation fine de cette étape permet l'obtention de plusieurs ARN matures, et donc plusieurs protéines, à partir d'un seul ARN primaire. On parle alors d'épissage alternatif.

L'ARN mature est transporté hors du noyau à travers les pores nucléaires, et la traduction en chaîne d'acides aminés se déroule dans le cytoplasme. Le ribosome progresse pas à pas de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' de l'ARNm. À chaque triplet de nucléotide, il associe l'ARN de transfert portant l'acide aminé correspondant selon le code génétique, et forme une liaison peptidique entre chaque acide aminé. Pour finir, la lecture d'un triplet correspondant à un codon STOP entraîne l'arrêt de la synthèse protéique.

b. L'initiation de la transcription est une étape fondamentale de régulation de l'expression génique.

La synthèse de protéine est sujette à régulation, car la plupart des protéines assurent une fonction nécessaire à un instant donné, et dans un ensemble de cellules déterminé, même si l'information dont elles sont issues est présente dans toutes les cellules. Par ailleurs, l'expérience a montré que seuls quelques pourcentages du génome sont en cours de transcription à un instant donné dans une cellule.

Toutes les étapes décrites ci-dessus sont soumises à des mécanismes régulateurs. Parmi eux, le contrôle de l'initiation de la transcription est prééminent car il se situe en amont des autres étapes. Il évite ainsi la synthèse d'intermédiaires inutiles, qui est coûteuse en temps et en énergie.

Le contrôle de l'initiation de la transcription est extrêmement complexe, au point que des règles générales à ce sujet n'existent que le temps suffisant à les remettre en cause par de nouveaux travaux. Ainsi, les paragraphes suivants tenteront de donner une vision actualisée de ces mécanismes de contrôle et des acteurs qui les sous-tendent.

II. Régulation de la transcription par les séquences d'ADN entourant le gène.

a. Le promoteur minimal

Le nom de promoteur décrivait à l'origine une séquence en amont de la séquence codante du gène, et commune à tous. Dans l'état actuel des connaissances, il s'agit plutôt d'une région de séquence variable, entourant le site d'initiation de la transcription (noté +1) sur environ 70 paires de bases (bp). Cette modularité du promoteur participe à la régulation de l'expression de chaque gène.

Les promoteurs des gènes de classe II codant pour les protéines, comprennent de façon non systématique les éléments suivants : une « boîte TATA » (site de liaison de TBP), un site de liaison de TFIIB (BRE), un site d'initiation (Inr) et un « élément de promoteur en aval » (downstream promoter element, DPE) (Figure 1). Les deux derniers semblent coopérer et se substituent parfois à la boîte TATA dans la liaison du complexe TFIID. Par ailleurs, le BRE est essentiel, chez les archéobactéries, à la bonne orientation de la transcription.

i. La boîte « TATA »

Découverte en 1979 comme le premier élément conservé du promoteur des gènes eucaryotes de classe II, la séquence TATA se situe environ 20 à 35 bp en amont du site d'initiation chez les mammifères et *D. melanogaster* (pour une revue (Smale et Kadonaga, 2003)). Chez la levure, cette distance peut atteindre de 40 à 120 bp. La séquence consensus, à l'origine très restrictive, se révèle aujourd'hui assez souple : TATA-AouT-AAAGouA (Patikoglou et al., 1999). Le recrutement de la machinerie de transcription via TBP a aussi été observé sur des motifs riches en A/T très différents de ce consensus (Zenzie-Gregory et al., 1993). Étonnamment, la boîte TATA n'est pas présente dans tous les promoteurs, comme le montre deux études bioinformatiques

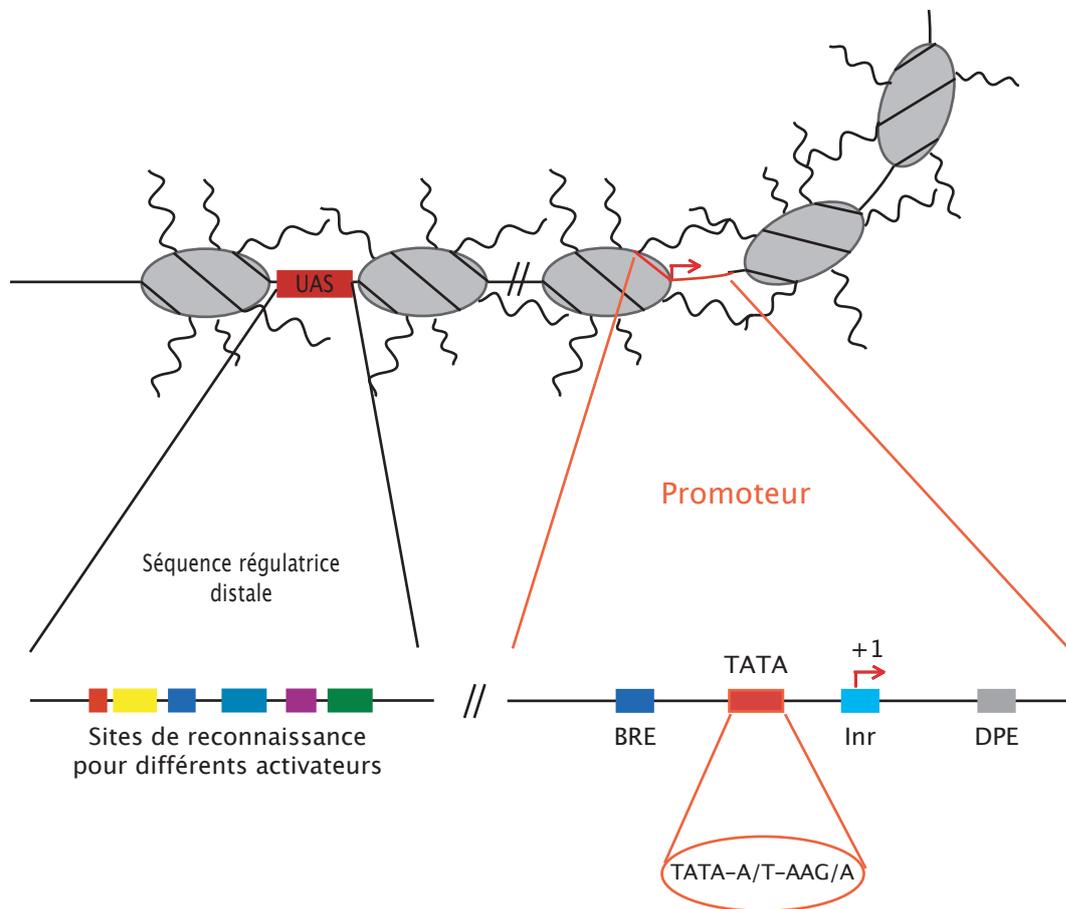


Figure 1 : **Structure du promoteur, et séquences régulatrices.**

Deux zones importantes d'un gène sont détaillées : à gauche, la séquence régulatrice distale ou UAS comprend des domaine de liaison pour différents activateurs. À droite, le promoteur peut contenir une boîte TATA (rouge), un élément de reconnaissance de TFIIB (en bleu foncé), un site d'initiation (en bleu clair) et/ou un domaine de reconnaissance en aval (en gris).

portant sur plus de 1000 promoteurs : chez la drosophile, 30 à 40% possèdent en amont du site d'initiation un motif proche du consensus (*Kutach et Kadonaga, 2000*). C'est le cas pour environ 32% des promoteurs analysés chez *H. sapiens* (*Suzuki et al., 2001*). Cependant, la reconnaissance d'une séquence au minimum riche en A et T par les facteurs d'initiation de la transcription est un processus conservé chez pratiquement tous les êtres vivants, puisque de telles séquences existent même chez certains protozoaires (*Singh et al., 1997*).

La boîte TATA est reconnue par TBP (TATA binding protein), et par quelques uns de ses homologues, TLF et TRF, existants chez de nombreux organismes. La diversité des protéines reconnaissant la boîte TATA offre une occasion supplémentaire de réguler la transcription à son stade initial (voir paragraphe III.b.i).

ii. Le site d'initiation Inr

Si chaque séquence codante débute par une Adénosine, des études par mutagenèse ont montré que les nucléotides entourant cette Adénosine déterminent aussi l'exactitude du site d'initiation. En effet, une cystéine précède généralement le +1, et les positions de -3 à +5 forment une séquence de reconnaissance appelée « Inr » ayant un rôle similaire à celui de la boîte TATA. La séquence consensus généralement admise pour les promoteurs humains est TCA-GouT-T-TouC (*Lo et Smale, 1996*). Elle diffère légèrement chez des organismes moins évolués tels que *D. melanogaster*. Cet Inr peut suffire à initier la transcription *in vitro* et *in vivo*, en l'absence de boîte TATA canonique (*Smale et Baltimore, 1989*). Certains facteurs de transcription comme Sp1 semblent même préférer les promoteurs à Inr dépourvus de TATA (*Emami et al., 1995*). Cependant, les deux éléments fonctionnent généralement en synergie pour favoriser l'initiation de la transcription par les GTFs. Le complexe TFIID reconnaît en effet le site d'initiation, au même titre que la boîte TATA si celle-ci est présente, et sa liaison aux deux éléments stabilise son interaction avec le promoteur (voir paragraphe III.b.ii).

Indépendamment, l'Inr est reconnu par le facteur TFII-I, qui peut déclencher la formation d'un complexe de pré-initiation comprenant TFIID. Ce mécanisme constituerait une alternative à l'organisation classique du complexe de pré-initiation (PIC), dans lequel le facteur déterminant serait la présence d'un élément Inr et non pas d'une boîte TATA (*Roy et al., 1993*). Les spécificités fonctionnelles de cette initiation soumise à TFII-I sont à l'heure actuelle mal connues, et n'ont pas fait l'objet de confirmations récentes (*Smale et Kadonaga, 2003*).

iii. Le site de reconnaissance de TFIIB ou BRE

Le facteur général de transcription TFIIB est le seul, avec TFIID, pour lequel un domaine spécifique de liaison ait été identifié. Ce fut le cas d'abord pour des organismes très anciens (*Hain et al., 1992*), puis chez les eucaryotes supérieurs (*Lagrange et al., 1998*). Le BRE (TFIIB recognition element) se situe en amont de la boîte TATA et, chez les archéobactéries, oriente la liaison de TBP qui est largement symétrique chez cet organisme (*Tsai et al., 1998*). Ce rôle n'est pas conservé chez l'homme, dont la TBP est asymétrique et orientée à distance par des activateurs. Au contraire, le BRE humain semble avoir évolué d'activateur de la transcription en répresseur. Le recrutement de TFIIB sur le BRE paraît, en effet, limiter la transcription en l'absence d'activateurs recrutés sur des éléments de reconnaissance distaux (*Evans et al., 2001*).

iv. Le site de régulation en aval ou DPE

De séquence consensus assez lâche (AouG-G-AouT-CouT-GouAouC), le DPE (Downstream promoter element) fut identifié pour sa capacité à favoriser le recrutement de TFIID sur des promoteurs dépourvus de boîte TATA (*Burke et al., 1998*). Il se situe de 28 à 30 bp en aval de l'Inr dont il est

dépendant (*Kutach et Kadonaga, 2000*), ce qui le différencie de la boîte TATA. En effet, TBP peut initier la transcription seule sur une boîte TATA, parfois en l'absence d'Inr, ce que ne permet pas un DPE seul.

Une autre différence vient de l'effet du complexe NC2/dr1-drap1 recruté sur chacun des deux motifs. Ce complexe de transcription atypique agit en répresseur sur un promoteur soumis à une boîte TATA, mais en activateur sur un promoteur dirigé par un DPE (*Willy et al., 2000*). Là encore, la structure du promoteur détermine, en fonction du facteur de transcription présent, l'état actif ou inactif du gène.

La recherche de DPE par criblage d'une bibliothèque de promoteurs de *D. melanogaster* a montré qu'environ 40 % contiennent la séquence consensus décrite ci-dessus, associée ou non à une boîte TATA (*Kutach et Kadonaga, 2000*). Cependant, cette étude a aussi révélé la conservation de résidus entre l'Inr et le DPE qui favoriseraient l'activation de la transcription. La séquence appelée DPE est donc probablement plus variable et étendue que supposée à l'origine. Elle existe aussi dans le génome humain, mais diffère légèrement de son homologue de drosophile (*Smale et Kadonaga, 2003*).

b. Séquences régulatrices distales

En complément du promoteur, la région située immédiatement en amont comprend souvent un ensemble d'éléments de reconnaissance spécifiques de facteurs de transcription tels que Sp1, NF-I, NF-Y (*Blackwood et Kadonaga, 1998*).

Cependant, la régulation la plus étonnante vient des séquences qualifiées d'enhancer ou silencer. Situés chez les mammifères à grande distance du promoteur, parfois dans les introns du gène, ces domaines ont la capacité de réguler la transcription en amont ou en aval. Ils recrutent des activateurs ou répresseurs qui collaborent avec les facteurs liés au promoteur pour définir l'état actif ou inactif du gène (*Khoury et Gruss, 1983*).

Chez la levure, le nom originellement donné à ces séquences est « Upstream Activating Sequence » ou UAS. Les « enhancers » ou UAS sont des sites de liaisons des activateurs de la transcription (Gal4 chez *S. cerevisiae* par exemple). À la différence des enhancers de mammifères, ils se situent beaucoup plus près du promoteur et ont une action unidirectionnelle (*Guarente, 1988*).

Les mécanismes permettant une communication moléculaire à une telle distance ont été le sujet de nombreux modèles, car l'enroulement de l'ADN sur lui-même ne suffit pas à expliquer le rapprochement du promoteur et de l'enhancer. Cependant, trois hypothèses ont été proposées. D'une part, une boucle peut être formée par des facteurs liés à l'enhancer reconnaissant un « point d'ancrage » (un autre facteur) sur le promoteur. D'autre part, un facteur lié à l'enhancer peut parcourir l'ADN jusqu'à trouver le promoteur. Enfin, un ensemble de facteurs peuvent organiser l'ADN en une série de boucles afin de rapprocher promoteur et enhancer (pour une revue (*Bondarenko et al., 2003*)). Cette dernière possibilité paraît cependant moins séduisante, si l'on considère l'encombrement stérique déjà occasionné par les nombreux nucléosomes présents entre les deux éléments.

Une autre particularité des séquences enhancer ou silencer est leur régulation par des « insulators ». Ceux-ci assurent que l'influence d'une séquence régulatrice distante ne s'étend pas au-delà du locus ou de l'ensemble de promoteurs qu'elle doit réguler (*Blackwood et Kadonaga, 1998*).

III. Acteurs de l'initiation de la transcription

a. L'ARN polymérase II

i. Les ARN polymérases, évolution et conservation

Les ARN polymérases sont les enzymes responsables de la synthèse de l'ARN correspondant à la séquence ADN du gène à transcrire. Ce mécanisme étant essentiel à toute forme de vie, elles sont très conservées à travers l'arbre phylogénétique, autant dans leur structure que dans leur mode d'action (Ebright, 2000). Constituée de 4 sous-unités, la polymérase d'*E. coli* est autosuffisante pour reconnaître un promoteur et initier la transcription. Sa sous-unité sigma (σ) dirige la polymérase vers les séquences consensus d'initiation, et se détache quand les premières liaisons phosphodiester ont été formées. Ainsi, elle pourrait être l'ancêtre des facteurs généraux de la transcription, ce que confirme sa structure (pour une revue (Murakami et Darst, 2003)).

Chez les mammifères en revanche, les polymérases comprennent au moins 10 sous-unités, et ne sont pas autosuffisantes. L'intervention d'autres facteurs indépendants est nécessaire autant à la reconnaissance du promoteur qu'à l'initiation de la synthèse d'ARN. La complexité grandissante de la régulation de l'expression génique va ainsi de pair, à travers l'évolution, avec le nombre croissant de facteurs nécessaires à son bon déroulement.

De plus, trois polymérases avec des spécificités distinctes ont été identifiées chez les eucaryotes : elles partagent une structure et quelques sous-unités communes, mais ne transcrivent pas les mêmes groupes de gènes. La polymérase I s'attache à transcrire les grands ARN qui forment le ribosome (ARNr). La polymérase II, décrite plus précisément ci-dessous, synthétise les ARN pré-messager qui seront traduits après épissage en protéines, mais aussi les petits ARN U1 à U12 qui s'intègrent aux RNPsn (particules nucléaires ribonucléoprotéiques ou « small nuclear ribonucleoproteins »). Ces dernières participent aux mécanismes d'épissage et de maturation des ARN en général, mais leurs fonctions spécifiques sont mal connues.

La polymérase III, enfin, transcrit certains petits ARN stables, tels les ARN de transfert et l'ARNr 5S (par exemple U6).

ii. L'ARN polymérase II

Chez les eucaryotes, l'ARN polymérase II est constituée de 12 sous-unités conservées de la levure à l'homme (Rpb 1 à Rpb12), dont deux forment un complexe

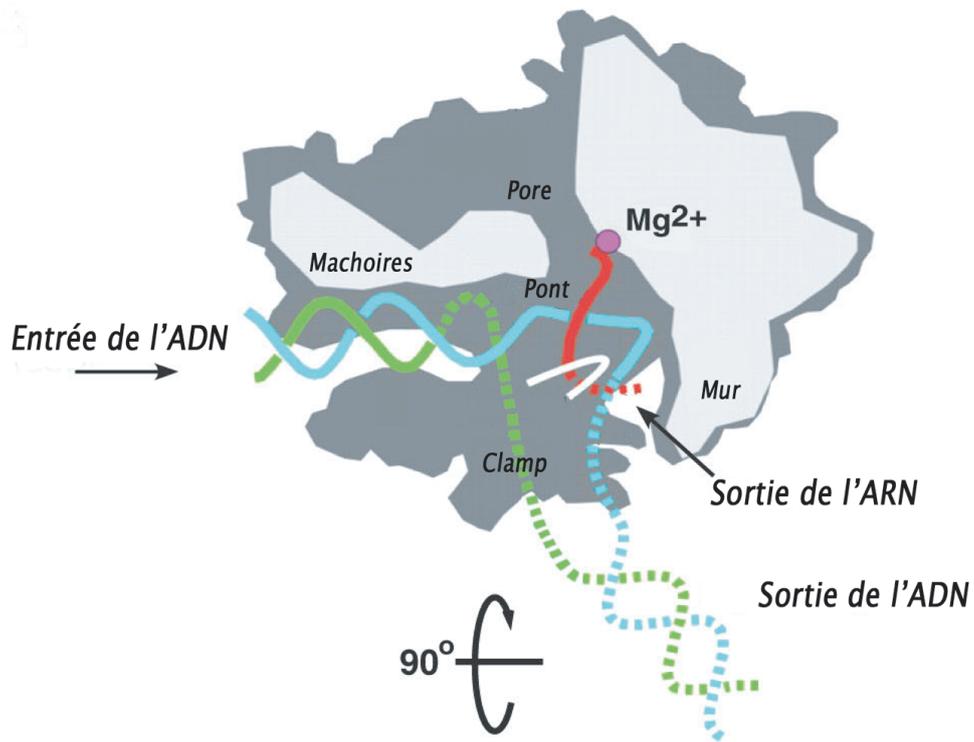


Figure 2A : **Représentation schématique de l'ARN polymérase II.**

L'ensemble de la structure est vu de haut, en cours de transcription. Les sites d'entrées et de sortie de l'ADN sont représentés, ainsi que la sortie de l'ARN et le site catalytique autour de l'ion Mg^{2+} (adapté de (Hahn, 2004)).

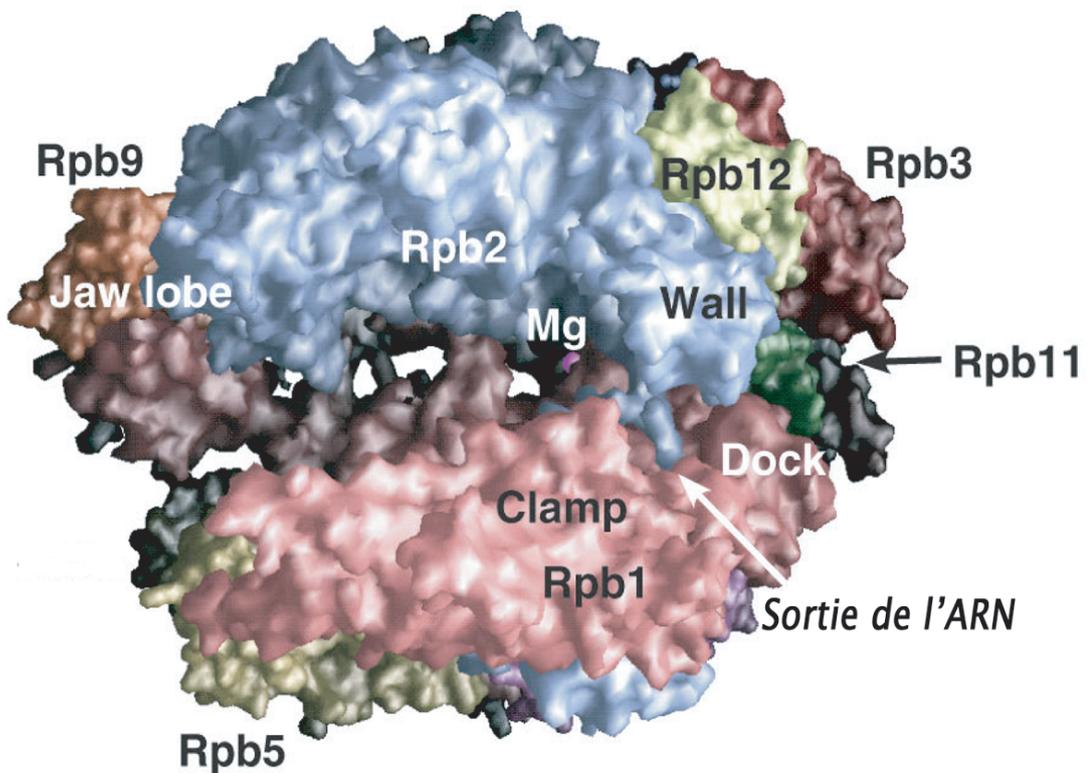


Figure 2B : **Structure tridimensionnelle obtenue par cristallographie de l'ARN pol II.**

Cette représentation correspond à une rotation de 90° de la précédente. Les sous unités sont représentées par des couleurs différentes (adapté de (Hahn, 2004)).

labile (Rpb4/Rpb7). Celui-ci semble avoir une fonction de régulation sur le reste du complexe dit « cœur de l'ARN pol II ».

1. Structure

Grâce à de nombreuses études de microscopie électronique, de RMN et de diffraction des rayons X, la structure fine de la polymérase est bien connue, même si elle ne répond pas à toutes les interrogations sur les processus d'initiation et d'élongation de la transcription.

Dès les premiers résultats, un sillon fut identifié entre les deux plus grandes sous-unités Rpb1, et Rpb2 (Figure 2). L'une de ses faces est une pince mobile et son extrémité est bouchée par une partie de Rpb2, appelée « mur », au niveau duquel se trouve le site catalytique. À ce même endroit s'ouvre un pore vers l'extérieur du complexe, à un angle de 90° par rapport au sillon.

La combinaison d'études structurales et de modélisation a permis de situer l'ADN dénaturé et l'ARN dans l'enzyme active : le sillon central permet l'entrée de l'ADN ouvert, et la formation au niveau du site catalytique d'un duplex ADN simple brin/ARN sur 9 paires de bases. À la fin du sillon, ADN et ARN se séparent, et le pore en forme d'entonnoir inversé permet la sortie soit de l'ARN synthétisé soit de l'ADN simple brin (Cramer, 2004).

Comme la séquence d'acides aminés, la structure de l'ARN polymérase est très conservée : l'étude de complexes bactériens a conduit à des conclusions qui ont été utilisées parfois pour établir un modèle du complexe eucaryote. Ainsi le site actif des ARN polymérases de thermophiles contiendrait deux cations métalliques complexés. Sosunov et al. en ont déduit un modèle de fonctionnement des ARN polymérases de toutes espèces, où la présence d'un ion métallique est toujours requise. L'autre ion serait nécessaire à la transition de l'activité de polymérisation d'ARN du complexe à l'activité de dégradation d'ARN (Sosunov et al., 2003).

Un grand pas a été franchi récemment avec la cristallisation par deux équipes indépendantes du complexe ARN polymérase II complet, incluant les deux sous-unités régulatrices Rpb4 et Rpb7 (Armache et al., 2003 ; Bushnell et Kornberg, 2003). L'hétérodimère forme une protubérance liée à la structure de cœur sous la base de la pince, empêchant probablement l'ouverture de celle-ci en conformation non-active. Cette position détachée par rapport au complexe de cœur en fait une cible de choix pour les facteurs de transcription ou enzymes régulant l'activité de l'ARN pol II, comme le suggérait des interactions bipartites déjà observées *in vitro* (Kimura et al., 2002).

2. Le domaine carboxy-terminale.

La sous-unité Rpb1 de l'ARN pol II est caractérisée par un domaine carboxy-terminal (CTD) formé de séquences répétées (YSPTSPS) en nombre variable selon les espèces (26 répétitions chez la levure, 45 chez la drosophile, 52 chez les mammifères par exemple). Son importance a été très tôt remarquée, car sa délétion *in vivo* est létale autant chez la levure que chez la souris (Allison et al., 1988 ; Bartolomei et al., 1988 ; Meininghaus et al., 2000). Cependant, le CTD n'est pas indispensable à la transcription *in vitro*. Notons qu'il s'agit d'un domaine non structuré et protubérant hors du complexe, ce qui en fait un partenaire de choix pour les régulateurs de l'ARN pol II (complexe médiateur (Kim et al., 1994) et GTFs).

En effet, cette régulation passe en partie par la phosphorylation du CTD. L'heptapeptide YSPTSPS inclut 5 résidus potentiellement phosphorylables, ce qui fait du domaine une cible privilégiée de nombreuses kinases. En particulier, les kinases dépendantes de cyclines (CDK) sont connues pour phosphoryler le CTD (pour une revue (Palancade et Bensaude, 2003)). Ces phosphorylations constituent une des nombreuses voies de régulation de la transcription.

Comme nous le verrons plus loin, l'action des kinases du GTF TFIIF est primordiale dans la transition de la polymérase d'un état d'initiation à un état d'élongation.

b. Facteurs généraux de la transcription :

L'ARN polymérase II, de même que ses homologues I et III, ne peut initier seule le processus de transcription. Son recrutement au promoteur nécessite la présence de complexes multiprotéiques, dits facteurs généraux de la transcription (« General Transcription Factors », GTF). Parmi les 6 (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIF), certains favorisent l'interaction entre l'ADN et la polymérase car ils reconnaissent des séquences consensus du promoteur (*Martinez, 2002*), tandis que d'autres ouvrent la double hélice au site d'initiation.

i. TBP et ses homologues

TBP est une sous-unité du GTF TFIID, qui, dans un modèle classique d'initiation de la transcription, se lie à la boîte TATA et déclenche le processus d'initiation.

1. La « TATA binding protein », TBP

La séquence du gène de la protéine qui reconnaît la boîte TATA fut identifiée et clonée en 1989 pour la levure, et 1990 pour la drosophile et l'homme (*Hernandez, 1993*). Quelque temps auparavant, le facteur général de transcription TFIID, qui assure ce que l'on croyait être la même fonction, avait été isolé et décrit (*Buratowski et al., 1989*). Il fallut des expériences de transcription *in vitro* pour distinguer les activités TBP et TFIID. En effet, le second est capable d'initier la transcription dans un système reconstitué en réponse à des activateurs (transcription activée) tandis que TBP ne répond pas aux activateurs, et n'assure que la transcription basale (*Greenblatt, 1991*).

La protéine TBP a fait l'objet de très nombreuses études. Elle paraissait être jusqu'il y a quelques années le facteur universel de reconnaissance du promoteur (*Burley et Roeder, 1996*). Elle assume un rôle central dans l'initiation de la transcription, comme le montre à la fois la conservation de sa séquence à travers l'évolution, et le phénotype létale précoce de souris « KO » pour *tbp*. En effet, la délétion du gène de *mTBP* empêche le développement de l'embryon, à partir du stade où la protéine d'origine maternelle n'est plus présente (*Martianov et al., 2002b*). Des expériences de délétion de gène *in vivo*, appelées « knock out », seront souvent citées dans ce travail, c'est pourquoi j'utiliserai l'acronyme KO pour les désigner.

Le domaine carboxy-terminal dit « cœur » de TBP est formé de deux séquences répétitives imparfaites, qui lui confèrent une structure tridimensionnelle en forme de selle de cheval. Cette structure est capable de lier le petit sillon de l'ADN (*Kim et al., 1993a ; Kim et al., 1993b*), et de le courber en refermant le grand sillon. La liaison de TBP ouvre la double hélice sur environ 1/3 de tour. À l'inverse, sa portion amino-terminale s'est révélée non indispensable au mécanisme de transcription de base. Elle semble réguler l'affinité de TBP pour l'ADN en empêchant la courbure de l'ADN (*Reese, 2003*).

L'interaction asymétrique de TBP avec la boîte TATA ne joue pas un rôle déterminant dans l'orientation de la transcription par l'ARN pol II. En effet, le choix d'une transcription vers l'amont ou l'aval du promoteur est orienté par l'organisation en complexe de pré-initiation (PIC) des facteurs généraux de transcription.

2. TBP n'est pas unique

Le caractère universel de TBP dans l'initiation de la transcription est aujourd'hui largement remis en cause par l'identification de paralogues. Ils existent chez de nombreux organismes, et sont séparés en deux familles selon qu'ils reconnaissent ou non la boîte TATA (pour une revue (*Davidson et al., 2004 ; Muller et Tora, 2004*)).

Par exemple, TRF1 (TBP related factor 1) de *D. melanogaster* est capable de se lier au promoteur et fait partie de la première famille. Il est connu uniquement chez cette espèce (*Crowley et al., 1993*), et semble plus spécifiquement utile à la transcription par l'ARN polymérase III. Cependant, il régule aussi une famille de gène de classe II, *tudor*, caractérisée par deux promoteurs, l'un spécifique de TRF1 et l'autre de TBP (*Holmes et Tjian, 2000*).

Récemment, des paralogues de TBP ont été identifiés chez les vertébrés, et nommés TBP2 (ou TRF3) du fait de leur forte identité de séquence avec TBP (*Bartfai et al., 2004*). Chez le poisson zèbre, TBP2/TRF3 reconnaît la boîte TATA, et s'assemble avec TFIIA et TFIIB *in vitro*. Il est particulièrement exprimé dans les gonades féminines à l'âge adulte.

Enfin, TRF2/TLF est un paralogue essentiel, identifié chez *C. elegans*, *X. laevis* et le poisson zèbre. En revanche, il n'est pas nécessaire au développement chez les mammifères, mais de façon similaire à TBP2, se révèle indispensable à la spermatogénèse (*Martianov et al., 2002a*).

Ces observations suggèrent que des familles de paralogues de TBP établissent un programme transcriptionnel spécifique à la gamétogénèse mâle ou femelle (pour une revue (*Davidson et al., 2004 ; Muller et Tora, 2004*)). La présence d'un paralogue plutôt qu'un autre décide de l'expression de certains gènes, qui font la spécificité d'un type cellulaire, ou d'un certain stade du développement. Il s'agit d'un mécanisme de régulation de l'expression des gènes, au même titre que la présence d'activateurs ou de répresseurs.

ii. TFIID et les TAFs

Le facteur général de transcription TFIID est constitué de la TBP, et de 14 ou 15 « TBP associated factors » (TAFs) (pour une revue (*Albright et Tjian, 2000*)).

1. Rôle de TFIID :

La première étape de formation du complexe de pré-initiation est la reconnaissance du promoteur par le complexe TFIID. Il couvre une large séquence allant jusqu'à 35 paires de bases après le site d'initiation (Inr). Les TAFs interagissent avec l'Inr et le DPE, ce qui stabilise l'interaction du complexe avec le promoteur dans son ensemble. TBP étant le composant central de TFIID, on a longtemps pensé qu'il ne reconnaissait que les promoteurs pourvus de la boîte TATA. Mais, au contraire, des promoteurs de classe II dépourvus de la boîte TATA canonique requéraient TFIID pour être transcrits. Dans ce cas, l'interaction des TAFs avec les autres séquences du promoteur compense l'absence d'interaction forte entre TBP et la boîte TATA. La liaison de TFIID, et la formation du PIC peuvent suivre ainsi différents mécanismes, dépendant de la structure du promoteur (*Roeder, 1996*).

D'autres modes de régulation spécifiques des promoteurs existent, et participent à la finesse des mécanismes d'initiation de la transcription. Par exemple, le co-répresseur NC2 favorise l'arrivée de TFIID sur les promoteurs dépourvus de TATA, et l'empêche sur les promoteurs pourvus de TATA. D'autre part, des complexes TFIID différents ont été isolés en fonction du stade de différenciation et du type cellulaire (*Bell et Tora, 1999*). Il semble ainsi que la composition de TFIID soit modulable selon le promoteur auquel il se lie, et par conséquent selon le gène à transcrire. Cette modularité repose sur l'absence ou la présence de certains TAFs, ou le remplacement d'un TAF par un paralogue, comme décrit ci-dessous.

2. Les TAFs :

Alors que l'activité TFIID était connue et caractérisée, il fallut attendre quelques années pour identifier les protéines associées à TBP et responsable de la co-activation de la transcription par TFIID (chez la levure par exemple (*Poon et al., 1995*)). Ces TAFs (TBP associated factors) se sont révélés conservés chez tous les eucaryotes étudiés, autant dans leur séquence que dans leur fonction. Leur dénomination basée jusqu'à récemment sur leur poids moléculaire apparent ne permettait pas de rendre compte de cette conservation. Une nouvelle nomenclature a donc été proposée, distinguant à cette occasion les paralogues dont l'association avec TBP est avérée, de ceux pour lesquels ce n'est pas le cas (TAFs like) (*Tora, 2002*). Les TAFs seront nommés ici en accord avec la nomenclature décrite.

Les TAFs sont les principaux co-activateurs de TBP. Sans eux, l'initiation de la transcription déclenchée par un activateur dans un système reconstitué est très limitée (*Roeder, 1996 ; Verrijzer et Tjian, 1996*). Si les KO de TAFs chez la levure ne semblent pas affecter de manière globale la transcription des gènes, le manque de certains d'entre eux chez les mammifères entraîne un phénotype létal au stade embryonnaire, caractérisé avant cela par une dérégulation de la croissance et du cycle cellulaire (*Chen et Manley, 2000 ; Metzger et al., 1999*). Ces études et d'autres résultats de reconstitution *in vitro* (*Oelgeschlager et al., 1998*) tendent à prouver que le rôle de co-activation des TAFs ne s'applique pas globalement et uniformément à l'ensemble du génome. Les TAFs agissent spécifiquement sur certains promoteurs, en réponse à certains activateurs, dont ils reconnaissent les domaines d'activations (*Sauer et Tjian, 1997*). Cette régulation n'est pas une caractéristique de tous les activateurs, mais définit un mécanisme particulier à certains.

Les gènes codants pour les TAFs ne sont pas uniques, autant chez les eucaryotes simples que les mammifères. À titre d'exemple, plus d'une douzaine de gènes paralogues existent chez *H. sapiens*, et les mieux caractérisés sont spécifiques d'un type cellulaire ou orientent TFIID vers la transcription d'un sous groupe de gènes (*Hiller et al., 2004 ; Pointud et al., 2003*). Ils pourraient même être très nombreux, comme les formes variantes de TAF4 chez la souris (*Brunkhorst et al., 2004*).

Pour ne citer que quelques exemples, TAF7 a un paralogue TAF7L. Il le remplace dans les cellules germinales masculines, et permet probablement un programme de transcription particulier à la spermatogénèse (*Martianov et al., 2002a ; Pointud et al., 2003*).

D'autre par TAF6 δ , paralogue de TAF6 chez *H. sapiens*, implique TFIID dans la régulation de l'apoptose. Il diffère de TAF6 par une délétion dans le domaine « histone fold » (HFD), et peut être recoupé par des protéases appelés caspases. La forme digérée TAF6 δ cp ne peut former un hétérodimère avec le partenaire TAF9 de TAF6. Un complexe TFIID contenant TAF6 δ cp, et dépourvu de TAF9, régule la transcription de gènes qui orientent la cellule vers l'apoptose (*Bell et al., 2001*).

3. Étude structurale de TFIID :

L'étude structurale de protéine utilise le plus souvent la diffraction de rayons X ou la résonance magnétique nucléaire, qui fournissent des informations précises sur le positionnement relatif d'atomes dans l'espace. Cependant, ces techniques ne sont pas applicables aux complexes comme TFIID. Elles nécessitent en effet une très grande quantité d'analyte, qu'il faut reconstituer à partir de protéines recombinantes. À l'heure actuelle, il n'est pas possible de produire un complexe TFIID en quantité suffisante pour une expérience de cristallographie et de diffraction des rayons X.

Les laboratoires intéressés par l'organisation tri-dimensionnelle de TFIID se sont tournés vers la microscopie électronique. Cette technique permet d'observer au niveau moléculaire des structures dispersées sur un support, à travers leur signal d'absorption ou de diffraction d'un faisceau d'électrons. La

structure 3D est obtenue par la superposition de plusieurs milliers d'images à basse résolution, prise sous plusieurs angles, d'une population de complexes hautement purifiés, déposée sur un film de carbone. Cette méthode est extrêmement avantageuse car la quantité d'échantillon isolée classiquement sans surexpression suffit à une analyse.

Selon les observations faites au laboratoire du Dr L. TORA, en collaboration avec l'équipe du Dr P. Schultz, TFIID possède une structure globulaire (*Brand et al., 1999a*) (**Figure 3**). Une étude concomitante portant sur le groupe TFIID-TFIIA-TFIIB décrit des résultats similaires (*Andel et al., 1999*). Quatre lobes s'organisent autour d'un sillon accessible au solvant, qui pourrait être la zone d'interaction avec l'ADN. L'incubation du complexe avec un anticorps dirigé contre TBP a permis de localiser celle-ci dans le sillon accessible au solvant. Des immunolocalisations similaires ont été faites pour le complexe *scTFIID*, à l'aide de divers anticorps dirigés contre les TAFs (*Leurent et al., 2002 ; Leurent et al., 2004*) (**Figure 3**).

9 TAFs (**Figure 8**) possèdent un domaine « histone fold » (HFD), très similaire au domaine d'hétérodimérisation des histones. Des études *in vitro* ont montré que ces TAFs forment des paires hétérogènes, et peuvent même s'organiser en structure octamérique (*Selleck et al., 2001*). Il avait été suggéré que les TAFs dans TFIID forment

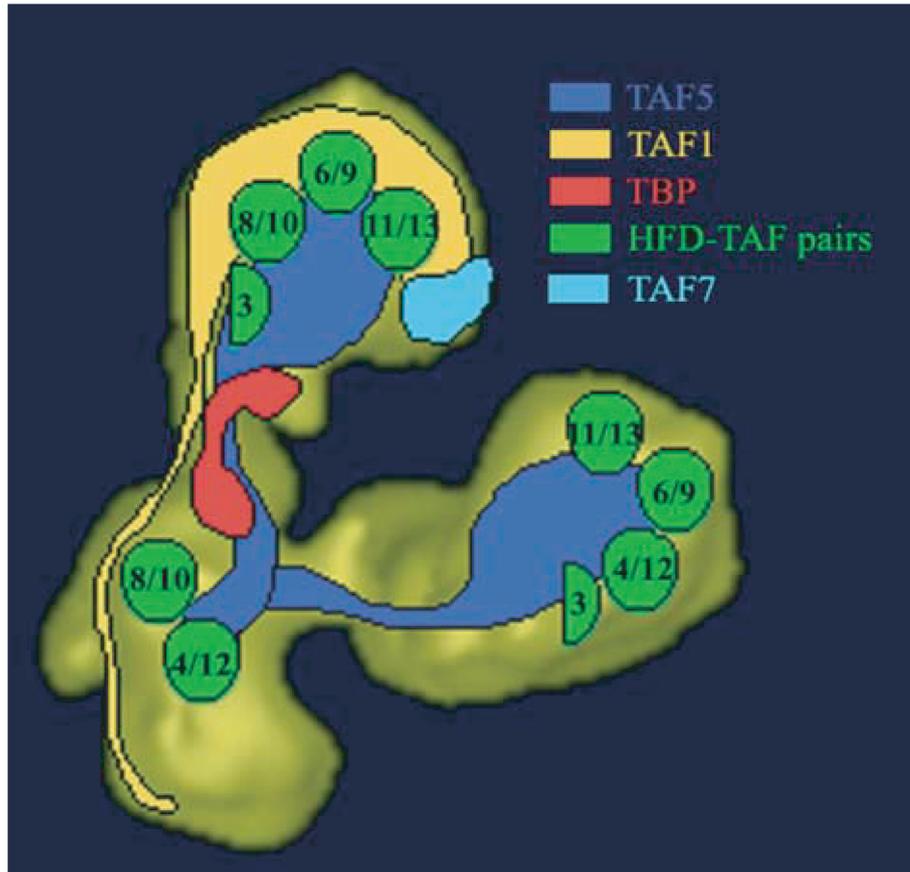


Figure 3 : **Structure tri-dimensionnelle de TFIID et localisation des TAFs.**

Les différents TAF, localisés par observation de complexes marqués avec des anticorps spécifiques ont été adjoints à la structure 3D obtenue par microscopie électronique. Chaque TAF est décrit par son numéro dans la nouvelle nomenclature, et avec une couleur selon la légende donnée. les TAFs appariés en hétérodimère sont dans un même cercle (adapté de (Leurent, 2004)).

un octamère et que l'ADN s'enroule autour du complexe comme autour d'un nucléosome (*Hoffmann et al., 1996*). Cependant, le volume de chacun des 4 lobes observés par microscopie électronique est de loin inférieur à celui que représenterait un octamère de TAFs. De plus, les immunolocalisations faites au laboratoire par Claire Leurent (*Leurent et al., 2002 ; Leurent et al., 2004*), montrent que les 8 ou 9 TAFs concernés ne sont pas présents dans un seul lobe (**Figure 3**). Certains apparaissent présents en plusieurs exemplaires, et se répartissent dans les lobes avec leur partenaire d'hétérodimerisation.

Cependant, cette hypothèse n'était pas infondée. Des travaux antérieurs portant sur les TAFs à HFD, et l'observation de l'enroulement de l'ADN en contact avec TFIID soutiennent l'hypothèse d'une structure octamérique au sein de TFIID (*Gangloff et al., 2001 ; Oelgeschlager et al., 1996*). Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps polyclonaux, susceptibles de reconnaître plusieurs fois une même protéine, dans les travaux de Leurent et al. jette un doute sur les localisations multiples des TAFs dans différents lobes du complexe. La controverse sur ce sujet n'est donc pas résolue à ce jour (*Reese, 2003*). Elle pourrait l'être rapidement par la mesure visuelle de la longueur d'ADN en interaction avec TFIID, qui devrait être longue s'il y a enroulement de l'un autour de l'autre.

iii. TFIIA

TFIIA est constitué de trois sous-unités de petite taille (α , β , γ) et stabilise très nettement l'interaction entre TBP/TFIID et la boîte TATA (*Weideman et al., 1997*). Il entre en compétition avec les événements répressifs de cette liaison, tel l'encombrement du site d'interaction avec l'ADN de TBP par la partie amino-terminale de TAF1, ou la présence des facteurs MOT1 et NC2 (*Lee et Young, 2000*).

iv. TFIIB

Le facteur TFIIB est bi-fonctionnel. Son domaine carboxy-terminal est l'élément d'ancrage du complexe ARNpol II/TFIIF dans le PIC, tandis que le domaine amino-terminal se lie directement au promoteur en amont de la boîte TATA, via le BRE (si celui-ci est présent). TFIIB est ainsi le premier facteur à donner une orientation au PIC (*Tsai et Sigler, 2000*). Sa structure détermine la position d'initiation de la transcription par rapport au site de liaison de TBP sur le promoteur (*Li et al., 1994*). Il a été montré récemment que TFIIB possède une activité acétyltransferase, et est capable de s'autoacétyler dans la partie carboxy-terminale. Cette modification sur la lysine K238 stabilise *in vivo* l'interaction avec TFIIF et joue par conséquent un rôle majeur dans l'activation de la transcription (*Choi et al., 2003*).

Enfin, TFIIB a probablement un rôle déterminant dans la conversion de l'ARN Pol II d'un état d'initiation à un état d'élongation. La dé-acétylation de la Lysine K238 et la phosphorylation du CTD pourraient être les événements déclencheurs de cette conversion, et du départ de l'ARN pol II.

v. TFIIF

TFIIF comprend deux larges sous-unités, RAP74 et RAP30. Il s'associe à la l'ARN polymérase II et favorise son interaction avec les facteurs de transcription déjà organisé sur le promoteur. Mais son rôle se prolonge après l'initiation. En effet, TFIIF réduit la probabilité d'échec du début de l'élongation, et plus généralement d'arrêt de la transcription, en gardant la polymérase liée à TFIIE et TFIIH (*Dvir et al., 2001*). Il favorise aussi la ré-initiation de la transcription, pour laquelle la formation d'un nouveau PIC n'est pas nécessaire. Il est d'ailleurs en compétition avec le médiateur pour lier pol II (*Rani et al., 2004*).

vi. TFIIE

Formé de deux facteurs qui s'hétérodimérisent, TFIIE est l'avant-dernier facteur à intégrer le PIC. À la fois indispensable au recrutement de TFIIH, et à l'activité hélicase de celui-ci, TFIIE joue un rôle essentiel dans l'ouverture de la double hélice au site d'initiation (Martinez, 2002). Il s'intègre au PIC en reconnaissant TFIIF et TFIID (Orphanides et al., 1996 ; Zewel et al., 1995).

vii. TFIIH :

La particularité de ce GTF tient dans la grande diversité de ses fonctions : il est à la fois essentiel à l'initiation de la transcription, à la maintenance de l'intégrité du génome, et à la régulation du cycle cellulaire. De façon concordante, il interagit avec de nombreux autres facteurs de transcription (pour une revue (Egly, 2001 ; Zurita et Merino, 2003)). TFIIH est constitué de 10 polypeptides, répartis dans deux sous-complexes de fonction complémentaire et indépendante.

Le corps du complexe est formé des hélicases dépendantes de l'ATP XPB et XPD (*Xeroderma Pigmentosum groupe B et D*), associées aux sous-unités p34, p52, p62 et p44. Il est plus particulièrement actif dans l'élimination des adduits indésirables de l'ADN, par un mécanisme de réparation appelé « Nucleotide Excision Repair » (NER). Cependant l'hélicase XPB joue aussi un rôle prédominant dans l'ouverture de la double hélice au site d'initiation de la transcription (Coin et Egly, 1998). XPD semble au contraire non indispensable à l'ouverture de l'ADN, mais sa présence permet une activité de transcription optimale. Elle est aussi la sous-unité de liaison entre le corps du complexe et le CAK « cyclin activating kinase complex ».

Celui-ci comprend Cdk7 (cyclin dependent kinase 7), la cycline H et Mat1. Son activité de phosphorylation est, entre autres choses, nécessaire à la transcription. En effet, cdk7 phosphoryle le CTD de l'ARN pol II, qui passe alors de l'état d'initiation à l'état d'élongation (Lu et al., 1992).

La modélisation par microscopie électronique de complexes endogènes purifiés, ainsi que la cristallisation de complexes recombinants partiels ont montré que TFIIH adopte une forme d'anneau portant un chaton. Le trou de cet anneau correspond à la taille de la double hélice d'ADN, et la protubérance semble contenir le CAK (Chang et Kornberg, 2000 ; Schultz et al., 2000).

Récemment, il a été montré que TFIIH joue aussi un rôle dans la transcription par l'ARN polymérase I des ARN ribosomaux. Mais dans ce cas, son action semble moins

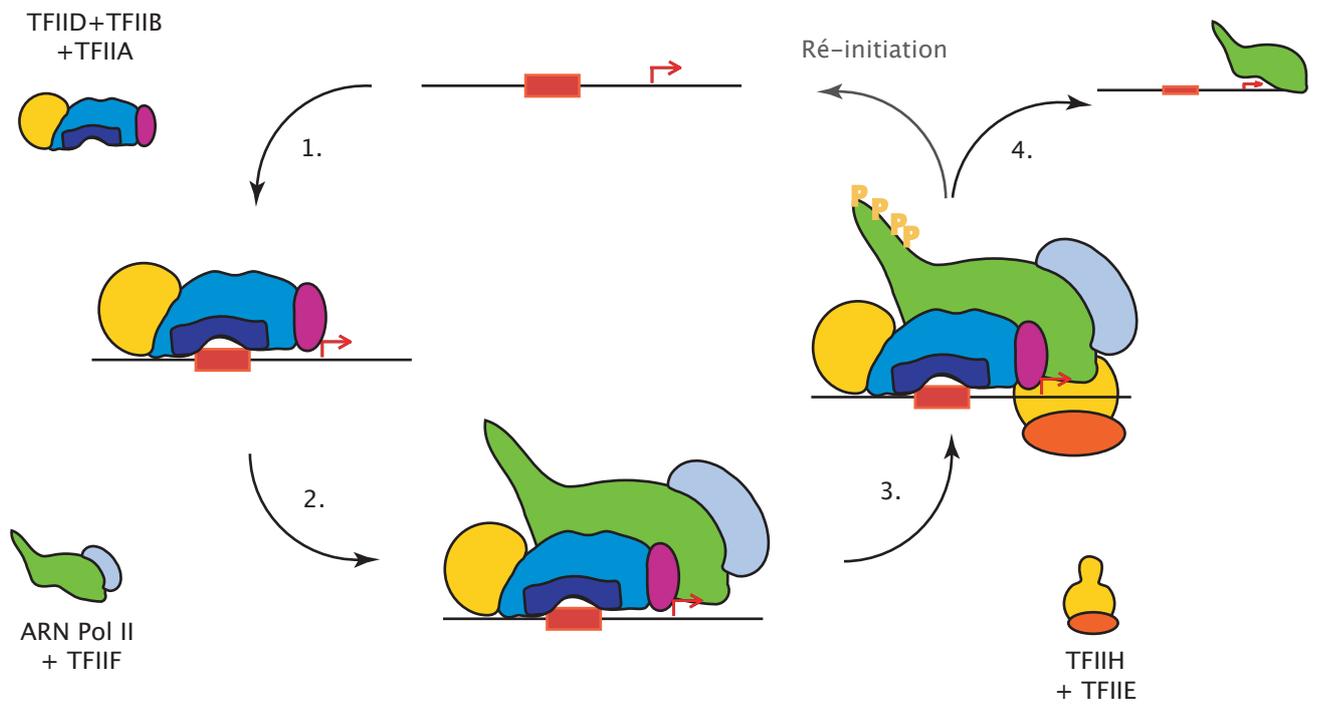


Figure 4 : **Assemblage séquentiel du complexe de pré-initiation.**

TFIID accompagné de TFIIA et TFIIB reconnaît le promoteur (1.), puis permet le recrutement de l'ARN pol II aidé de TFIIF (2.). L'arrivée de TFIIH et TFIIE déclenche l'ouverture de l'ADN et TFIIH phosphoryle la pol II (3.), qui est alors capable de quitter le promoteur (4.). Après le départ de pol II, certains GTF restés sur le promoteur (non représentés) peuvent ré-initier la transcription.

régulée et non dépendante de l'ATP. Elle pourrait être liée à la phase d'élongation plus que d'initiation (*Iben et al., 2002 ; Reese, 2003*).

viii. L'assemblage du PIC et la ré-initiation de la transcription.

L'ensemble des GTFs décrits ci-dessus, associé à l'ARN Pol II dans un PIC classique, forme une structure de plus de 30 polypeptides, et d'environ 2 Mda (*Dvir et al., 2001*) (**Figure 4**). La modélisation la plus courante de son assemblage suppose un processus par étape, l'arrivée d'un nouveau partenaire constituant à chaque fois une progression, de la reconnaissance du promoteur vers le départ de l'ARN polymérase. La première étape est le recrutement de TFIID sur le promoteur. Sa liaison est alors stabilisée par TFIIA et TFIIB. Cette plateforme D-A-B constitue une surface de reconnaissance pour l'ARN pol II associée à TFIIIF. Puis, TFIIF et TFIIIE viennent ouvrir la double hélice d'ADN et « préparer » l'ARN pol II à l'élongation (*Hahn, 2004*).

Ce modèle est concurrencé par celui d'un PIC pré-assemblé avant le recrutement sur le promoteur. De telles structures, appelées « holoenzyme », ont en effet été purifiées et contiendraient l'ARN pol II ainsi que certains GTF, le complexe Médiateur et des facteurs de remodelage de la chromatine (*Ossipow et al., 1995*).

Cependant, le modèle de l'holoenzyme ne concorde pas avec la ré-initiation de la transcription. En effet, après un premier cycle de transcription, d'autres peuvent s'enchaîner sans nouveau recrutement des GTFs et du Médiateur qui restent sur le promoteur (*Yudkovsky et al., 2000*). L'initiation *de novo* de la transcription est un événement rare, tandis que la ré-initiation assure la grande partie de la transcription. Il est donc peu probable que l'holoenzyme soit le mode majoritaire d'assemblage du PIC (*Svejstrup, 2004*).

Enfin, confirmant l'hypothèse d'une formation séquentielle, la composition du PIC est modulable. Les GTFs que l'on croyait universels se révèlent moins indispensables que prévu chez certains organismes, ou à différents stades du développement. Ceci constitue un niveau supplémentaire de régulation de l'expression génique.

ix. De l'initiation de la transcription à l'élongation :

Lors de son recrutement sur le promoteur, l'ARN polymérase II est placée au site d'initiation grâce à l'action combinée des GTFs et des éléments de reconnaissance du promoteur. Elle est alors dans une conformation qui ne favorise pas la polymérisation de nucléotides (conformation dite fermée). Cette conformation change largement avec l'ouverture de la double hélice (formation de la « bulle » de transcription) et la formation des premières liaisons phosphodiester (*Wang et al., 1992*). Les facteurs TFIIIE et TFIIF décrites ci-dessus prennent part à cette conversion. Le premier interagit en effet avec la polymérase à l'endroit des pinces qui entourent l'ADN (*Leuther et al., 1996*). Le second ouvre la double hélice d'ADN autour du site d'initiation et phosphoryle le domaine carboxy-terminal (CTD) de Rpb1. L'ARN pol II phosphorylée est alors dans une conformation d'élongation (*Lin et al., 2002*), et son interaction avec les facteurs qui la retiennent sur le promoteur est beaucoup moins forte : elle se détache du complexe de pré-initiation et commence à se déplacer le long de l'ADN (*Svejstrup, 2004*).

L'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II est complexe, sujette à régulation, et met en jeu de très nombreux acteurs. Ceci implique deux conséquences. D'une part, les occasions d'échec sont nombreuses, et l'ARN polymérase produit en général plusieurs ARN avortés avant d'être opérationnelle (*Holstege et al., 1997*). D'autre part, quand une protéine est requise en grande quantité rapidement, le gène est transcrit de nombreuses fois, et souvent par plusieurs polymérases à la fois. Certains GTFs et le

médiateur restent dans ce cas liés au promoteur, et le recrutement de la polymérase est qualifié de ré-initiation, processus plus rapide que l'initiation *de novo* (Zawel *et al.*, 1995).

c. Co-facteurs de la transcription

i. Introduction :

1. La chromatine est une barrière naturelle à l'initiation de la transcription.

La taille et le volume occupé par le matériel génétique d'une cellule ont longtemps été un problème crucial pour la compréhension des mécanismes cellulaires : comment une telle quantité d'ADN pouvait-elle tenir dans un noyau ? La microscopie électronique a permis d'observer les différents niveaux de compactions de l'ADN, puis la structure intime de la chromatine. L'ADN s'enroule par portions de 146 bp autour d'octamères d'histones, et cette succession de nucléosomes régulièrement espacés forme une structure de 11 nm de diamètre, appelée collier de perles. Elle constitue le premier niveau d'organisation du matériel génétique, et celui qui semble le plus problématique pour la transcription des gènes : l'ARN polymérase ne peut transcrire une séquence en la parcourant, que si celle-ci est, d'une façon ou d'une autre, libérée de cet enroulement autour des histones.

Par ailleurs, les nucléosomes forment des enroulements en solénoïde, qui donnent une fibre d'environ 30 nm d'épaisseur, elle-même surenroulée. Ces niveaux de compactions supérieurs restreignent aussi l'accessibilité de la chaîne d'ADN. Certaines portions du génome, qualifiée d'hétérochromatine, sont compactées de telle façon qu'elles sont pratiquement inactives. À l'inverse, les zones moins condensées visibles en microscopie électronique cellulaire sont appelées euchromatine.

L'expression des gènes étant un phénomène régulé dans l'espace et dans le temps, en fonction de l'état et la spécialisation de la cellule, l'accessibilité des gènes l'est aussi. Les paragraphes suivants et le chapitre 2 IV tenteront de donner un aperçu synthétique des rapports entre le processus de transcription et l'organisation de la chromatine.

2. Notion de transcription activée

Comprendre le mode d'action des facteurs dits activateurs ou répresseurs sur la transcription fut une des difficultés majeures de l'étude de la régulation de l'expression génique. Il fallut l'identification de plusieurs acteurs intermédiaires entre ceux-ci et les GTFs pour lever un coin du voile. Ces intermédiaires furent nommés co-facteurs (co-activateurs ou co-répresseurs), et forment maintenant une très large famille. Ils ont pour caractéristiques de ne pas se lier directement à l'ADN, mais influencent l'état transcriptionnel d'un gène. Cet effet est dicté par la présence de l'activateur ou du répresseur.

ii. Les TAFs

Au-delà d'une simple fonction structurale, les TAFs assurent des fonctions de co-activation spécifiques. Comme il a déjà été mentionné, leur association avec TBP dans le complexe TFIID permet l'activation de la transcription d'un promoteur donné en réponse à un activateur. Un ensemble important de résultats montrent que les TAFs interagissent directement avec de nombreux activateurs et répresseurs, et peuvent même les modifier.

1. Interaction avec des facteurs de transcription spécifiques

Les interactions *in vitro* entre TAFs et facteurs de transcription sont décrites en nombre. Leur rôle physiologique n'est cependant pas toujours vérifié. Il l'est dans le cas où l'interaction est observée dans le complexe, et qu'elle a un effet sur la liaison de TFIID sur un promoteur, ou sur l'état d'activation de ce promoteur.

Malgré ces restrictions, il est raisonnable de considérer que les TAFs constituent un ensemble très réceptif aux signaux de la machinerie cellulaire, transmis par le biais de facteurs spécifiques (pour une revue (Albright et Tjian, 2000)).

Des exemples de co-activation ont été décrits récemment :

dmTAF4 est un co-activateur du facteur de transcription spécifique des cytokines NFTA, dans un système *in vitro* contenant TFIID reconstitué (Kim et al., 2001). D'autre part, un ensemble de données *in vitro* et *in vivo* montrent que TAF9 stabilise p53 et co-active la transcription régulée par p53 (Buschmann et al., 2001). Un autre processus de régulation connu et documenté est le rôle essentiel de TAF4b dans l'activation de la transcription par NF- κ B, dans la réponse immunitaire (Yamit-Hezi et Dikstein, 1998 ; Yamit-Hezi et al., 2000). D'autres exemples pourraient être cités, telle l'interaction entre CREB (CyclicAMP Reponse Element Binding protein) et TAF4 (Felinski et Quinn, 2001), entre *dmTAF9* avec e(y)2 (Georgieva et al., 2001), ou enfin entre c-jun et TAF1 (Lively et al., 2001).

2. Interaction avec les récepteurs nucléaires

Les « TBP associated factors » semblent être des cibles privilégiées des récepteurs nucléaires. De nombreux travaux rapportent leur rôle essentiel dans l'activation de la transcription de promoteurs sur lesquels un NR est lié.

Ainsi, *hsTAF10* est nécessaire à l'activation par les récepteurs aux œstrogènes (Jacq et al., 1994). *DmTAF4* interagit avec le récepteur aux hormones thyroïdiennes (Petty et al., 1996), et son homologue humain est un co-activateur des récepteurs VDR, TR et RAR (Mengus et al., 1997). TAF11, lui, est spécifiquement requis pour la transcription activée par certains récepteurs nucléaires (RXR, ER et VDR) (Lavigne et al., 1999 ; Mengus et al., 2000). Enfin, TAF20 interagit avec VDR (Kurihara et al., 2004). Ces premiers travaux faisaient état d'interactions bipartites, mais il semble que l'ensemble des TAFs soit requis pour une activation optimale par les NR (Wu et al., 1999).

3. Fonctions enzymatiques

TAF1 est une histone acétyltransferase, mais aussi une kinase et une ligase d'ubiquitine : par ces activités, elle régule directement ou indirectement l'activation de la transcription (Wassarman et Sauer, 2001). Elle est la cible dans TFIID de nombreux activateurs, tels que la protéine Tat d'HIV1 (Weissman et al., 1998), ou l'oncogène MDM2 (Leveillard et Wasylyk, 1997). De plus, l'inactivation du domaine HAT de *scTAF1* dérégule l'expression d'environ 1% des gènes transcrits (O'Brien et Tjian, 2000). Cette activité est donc liée, directement ou indirectement, à l'activation de la transcription pour un ensemble de gènes. Mais elle n'a pas comme Gcn5 et Tip60 une fonction d'acétylation généralisée à tout le génome.

L'activité kinase de TAF1 est répartie chez les métazoaires en deux domaines enzymatiques actifs, aux deux extrémités de la protéine. Elle semble surtout essentielle à l'assemblage d'un PIC stable, par la phosphorylation de TFIIA et TFIIIF. En revanche, cette capacité à phosphoryler les GTFs ou d'autres substrats n'est pour le moment pas impliquée dans un processus de co-activation.

Enfin, l'activité de transfert d'ubiquitine a été découverte plus tardivement que les deux précédentes (Pham et Sauer, 2000), et son seul substrat connu est l'histone de liaison H1.

iii. Le complexe médiateur

L'existence du très large complexe Médiateur fut suggérée par un ensemble d'études génétiques et biochimiques chez *S. cerevisiae* (Myers et Kornberg, 2000). Sa purification homogène ne fut cependant possible qu'après l'identification complète des GTFs, qui apparaissent dans les mêmes fractions de purification (Kim YJ, 1994.Cell).

Chez *H. sapiens*, les divers systèmes de purification ont produit des complexes de tailles très différentes, TRAP (autre dénomination : DRIP, ARC, SMCC ou NAT) et PC2/CRSP, dont les capacités respectives de trans-activation ne sont pas arrêtées à ce jour (Lewis et Reinberg, 2003).

Les sous-unités du médiateur interagissent pour une grande part avec des activateurs : la sous-unité MED220, par exemple, est la cible des récepteurs nucléaires TR, VDR, RAR α , RXR α , PPAR γ , ER et AR. L'importance physiologique de ces interactions a été confirmée par des expériences KO chez *M. musculus*. Les sous-unités MED100 et MED220 sont essentielles au développement embryonnaire, et le KO de la seconde se caractérise par la dérégulation de la transcription dépendante de certains récepteurs nucléaires (Ito et al., 2000). Le complexe Med a donc indéniablement un rôle de co-activation de la transcription. Notons qu'il interagit et a une action synergétique avec les TAFs dans ce rôle (Guermah et al., 2001). Son action structurale dans la formation du PIC et le recrutement de l'ARN pol II a été aussi largement étudiée (Lewis et Reinberg, 2003).

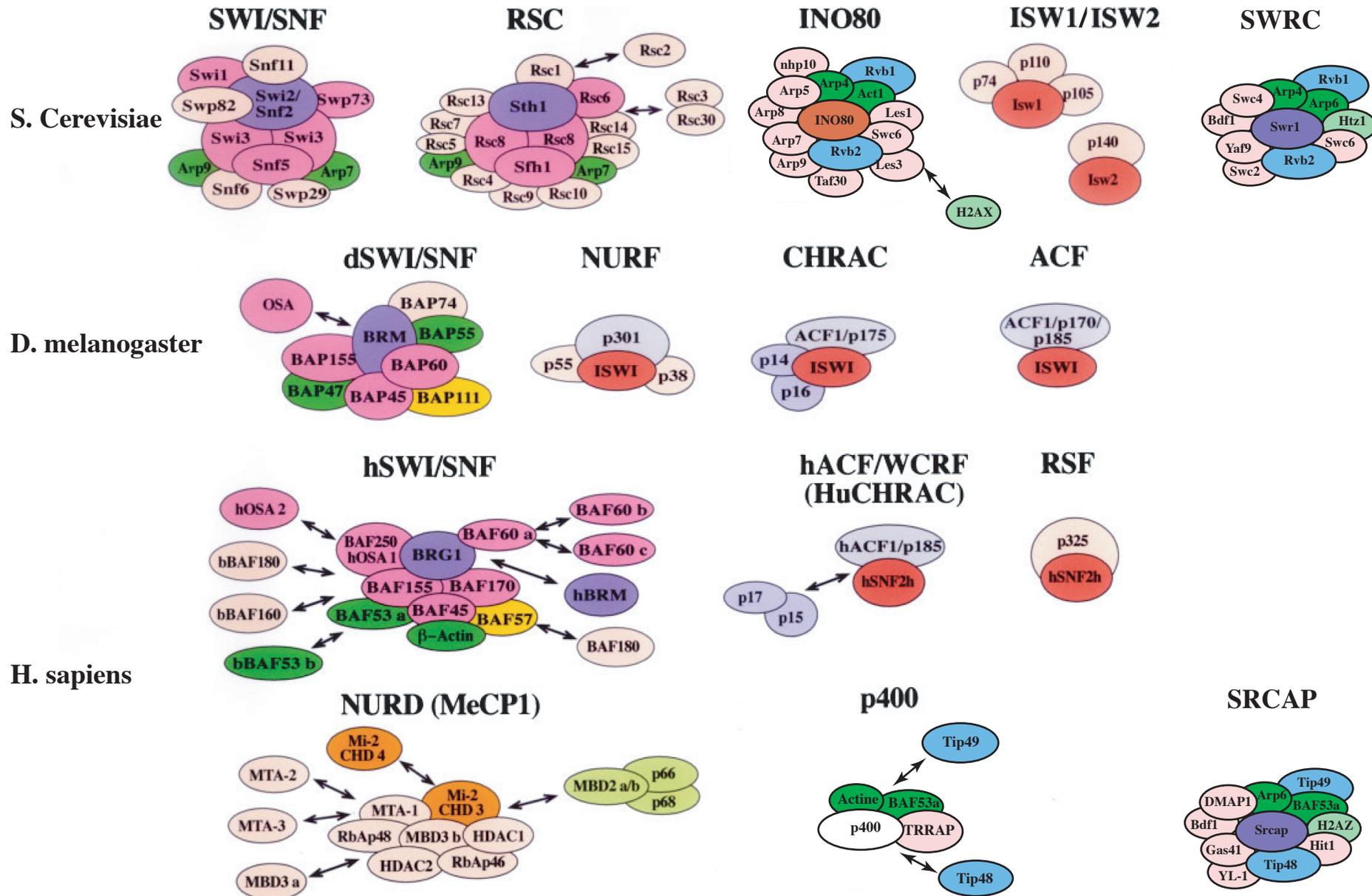


Figure 5 : **Diversité et modularité des complexes ATPases de remodelage de la chromatine.** Les enzymes ATPase sont colorées en mauve (famille Swi2/Snf2), en rouge (famille Iswi), en orange (famille Mi2) ou en blanc (p400). Les sous-unités conservées dans les différents complexes sont en rose, celles spécifiques de chacun en rose clair. Les protéines liées à l'actine sont en vert, et les hélicases de type Rvb en bleu. Enfin, apparaissent en jaune les sous-unités conservées parmi les complexes de drosophile, et en vert clair les variants d'histones (adapté de (Sif, 2004)).

iv. Enzymes de modifications post-transcriptionnelles.

Un chapitre entier de cette introduction étant consacré aux HAT (chapitre 2), nous ne détaillerons pas ici leur fonction. Cependant, comme les HDAC, kinases, ubiquitinasés, et méthyltransférases, elles participent à la régulation de la transcription soumise à des activateurs. Deux voies mécanistiques peuvent être distinguées. D'une part, les modifications des queues protubérantes des histones stabilisent ou déstabilisent les interactions des octamères avec l'ADN, et rendent ainsi plus ou moins accessibles les séquences codantes. Il a été montré qu'elles interviennent dans certains cas en réponse à un activateur lié au promoteur, par le biais d'une enzyme (HMT, HDAC, HAT...). Parallèlement, les acétylations, phosphorylations, ubiquitinations, et méthylations touchent aussi des facteurs de transcription, et modifient leur activité transcriptionnelle. Une illustration évidente de ceci est la phosphorylation du CTD de l'ARN pol II par différentes kinases, qui est le signal de départ de l'élongation.

La méthylation par l'enzyme PMRT d'EWS est un autre exemple. Ce co-activateur d'HFN4 est aussi un partenaire de TFIID (*Bertolotti et al., 1998*). La méthylation d'EWS régule sa localisation dans la cellule, et indirectement la transcription des gènes régulés par HFN4 (*Araya et al., 2005*). De très nombreux autres cas de modifications post-traductionnelles des facteurs de transcription sont décrits, et constituent un ensemble de mécanismes de régulation au cas par cas très spécifiques.

v. Les complexes de remodelages de la chromatine dépendant de l'ATP

Les enzymes capables de modifier l'arrangement des nucléosomes sur l'ADN en hydrolysant l'ATP sont nombreuses et agissent au sein de complexes multiprotéiques (**Figure 5**) Ceux-ci collaborent avec les complexes HAT décrit au chapitre 2 (paragraphe II et III). Ils partagent même de nombreux facteurs ce qui renforce l'idée de mécanismes intimement liés. La spécificité de chacun n'étant pas déterminée, j'ai choisi de les classer selon l'organisation de leurs séquences en domaines fonctionnels.

L'activation du domaine ATPase de ces enzymes peut dépendre de plusieurs facteurs, parmi lesquels la présence d'ADN nu, ou certaines modifications des queues d'histones : ainsi, l'ATPase ISWI n'est active qu'en présence de certains résidus (17 à 19) de l'histone H4. À l'inverse, l'acétylation de la lysine K12 d'H4 la rend inactive (*Corona et al., 2002*). Ceci est une illustration du caractère coopératif des différents mécanismes (physiques ou épigénétiques) participant au dynamisme de la structure chromatinienne.

1. Familles d'ATPases

SWI/SNF :

Chez la levure, Swi2/Snf2 fut le premier facteur identifié capable au sein d'un complexe multiprotéique et en présence d'ATP, de changer l'organisation des nucléosomes pour activer la transcription (*Cote et al., 1994 ; Hirschhorn et al., 1992*). On lui connaît depuis un paralogue, Sht1, qui est la sous-unité catalytique du complexe RSC, et des homologues chez la drosophile, la souris et l'homme (*dmBRM*, *BRG1/hsSnf2 β* , et *hsBRM*). Ces enzymes agissent au sein de complexes conservés à travers l'évolution et ont en commun la présence d'un bromodomaine en plus du domaine ATPase. Notons que ces complexes ne sont pas associés à l'activation de la transcription de façon systématique. Ainsi, le facteur BAP111 (Brahma Associated Protein 111) du complexe BRM de drosophile semble impliqué dans la répression de la transcription plutôt que dans son activation. Cet homologue de BAF57 chez l'homme recrute en effet des complexes répresseurs comme Sin3A (*Pal et al., 2003*).

Par ailleurs, un membre récemment découvert de cette famille, Swr1, a le rôle particulier de remplacer les histone H2A par un variant Htz1 près des zones d'hétérochromatine (Mizuguchi *et al.*, 2004). Il agit pour cela au sein du complexe multiprotéique SWRC proche du complexe HAT NuA4, par ses sous-unités, mais aussi par son activité (Krogan *et al.*, 2004a) (cf. chapitre 2, paragraphe III). L'équivalent de SWRC existe probablement chez l'homme (Cai *et al.*, 2005).

Deux homologues de Swi2/snf2 existent chez *H. sapiens*, BRG1 et hBRM, tous deux actifs au sein d'un complexe différent (Wang *et al.*, 1996a ; Wang *et al.*, 1996b).

ISWI :

Les ATPases de cette famille de complexes se distinguent de la précédente par deux domaines SANT situés dans la partie carboxy-terminale par rapport au domaine ATPase. Elles forment des complexes plus variés que SWI/SNF, mais qui ont en commun une activité ATPase beaucoup plus robuste que l'enzyme seule, et strictement dépendante de la présence de nucléosome sur l'ADN (Becker *et Horz*, 2002). La plupart telles qu'ACF, CHRAC et RSF ont la capacité de s'associer aux chaperons d'histones, pour espacer régulièrement ces nucléosomes, ce qui n'est pas le cas de SWI/SNF (Vaquero *et al.*, 2003) (Figure 5). Les complexes ISWI1, ISWI2 chez la levure, CHRAC, ACF chez l'homme ou NURF chez la drosophile ont cependant des activités différentes de remodelage de la chromatine.

INO :

L'ATPase INO80 est très conservée de la levure à l'homme. Elle n'a pas de domaine particulier, mais s'associe en complexe avec deux hélicases, Rvb1 et Rvb2 impliquées dans la formation de jonctions Holliday. Celles-ci sont retrouvées notamment dans le complexe humain TIP60 et le complexe p400 mentionné ci-dessous, ce qui sera d'un intérêt particulier pour notre étude (cf. chapitre 2 paragraphe III et Figure 8). Le complexe INO80 qui comprend comme SWI/SNF, RSC et p400 des protéines liées à l'actine β , est capable d'activer la transcription *in vitro* par remodelage de la chromatine, mais il est aussi indispensable à une réponse normale aux dommages de l'ADN (Shen *et al.*, 2000). De récents travaux ont montré, en effet, qu'INO80 est recrutée sur l'ADN endommagé par une interaction avec l'histone variant H2AX phosphorylé, (Morrison *et al.*, 2004 ; van Attikum *et al.*, 2004), et que sa présence régule la réparation de la cassure par recombinaison homologue (chez *A. Thaliana* (Fritsch *et al.*, 2004)).

MI/CHD :

Mi2/Chd1 de *S. cerevisiae*, dmMi-2 de *D. melanogaster*, et les quatre homologues humains Mi-2/CHD1, Mi-2/CHD2, Mi-2 α /CHD3, Mi-2 β /CHD4, présentent en amont du domaine ATPase deux chromodomaines successifs. Leur activité enzymatique semble dépendre plus des nucléosomes que de l'ADN lui-même. scChd1 restructure la chromatine de façon différente de SWI/SNF (Tran *et al.*, 2000), et a été identifié récemment dans le complexe SAGA (Pray-Grant *et al.*, 2005). Chez l'homme, les ATPase CHD font partie du complexe très versatile MeCp1/NuRD qui comprend les Deacetylases d'histones, HDAC1 et HDAC2. De par la présence des chromodomaines, les CHD participent très probablement à la répression de la transcription par NuRD en reconnaissant les méthylations des histones.

DOMINO/p400 :

Cette dernière famille récemment identifiée (Fuchs *et al.*, 2001) se caractérise par un domaine ATPase séparé en deux parties, et par l'absence d'homologue chez la levure. Le complexe p400 partage de nombreux facteurs avec le complexe Histone Acetyltransferase TIP60, dont les hélicases Tip48 et Tip49 (Figure 8). Cependant, il est dépourvue d'activité HAT. L'ATPase p400 peut interagir avec le facteur oncogène viral E1A, et recruter le complexe sur un promoteur.

2. Remodelage de la chromatine et différents processus liés à l'ADN :

De toute évidence, les complexes décrits ci-dessus comprennent des sous-unités dont le rôle n'est pas directement de déplacer les nucléosomes. Ils interagissent aussi de façon plus lâche avec de nombreux facteurs aux activités aussi diverses que le co-répresseur Sin3A, le facteur de transcription E2F, les hélicases TIP48 et TIP49. Ceci laisse supposer l'existence d'actions coordonnées visant à faciliter ou interdire l'accès de portion d'ADN là où l'intervention de tel ou tel processus est nécessaire. D'autre part, la versatilité de certains complexes ATPase renforce l'hypothèse qu'ils échangent avec d'autres structure des facteurs, et s'adaptent de cette façon au contexte dans lequel leur action est nécessaire (cf. **Figure 5** pour un résumé des complexes existants)

Cette inter-connection sera largement illustrée ultérieurement, dans l'introduction des mécanismes de réparation de l'ADN (chapitre 4). En effet, les facteurs de réparation communiquent aussi largement avec les complexes de remodelage.

Nous nous contenterons de rappeler ici que le remodelage de la chromatine est aussi un point de contrôle de l'état transcriptionnel d'un gène, par les activateurs. À titre d'illustration, le complexe SWI/SNF de levure est recruté sur le promoteur PHO8, en réponse au facteur de transcription Pho4, et avec l'aide du complexe HAT SAGA (*Gregory et al., 1999*). Ce premier exemple a été complété par de nombreux autres, montrant que les complexes capables de déplacer les nucléosomes sont recrutés de façon promoteur spécifique.

Indépendamment, un modèle propose que les enzymes BRG1/BRM et HDAC soient recrutées ensembles sur les promoteurs des gènes de cyclines et autres régulateurs du cycle cellulaire, en réponse aux répresseurs Rb. Ceci aboutirait à l'arrêt du cycle cellulaire, par l'établissement d'un état inactif sur les promoteurs de ces gènes (*Sif, 2004*).

vi. Les répresseurs de la transcription :

Certains TAFs, le complexe Médiateur, et certaines enzymes modifiant les protéines peuvent avoir un effet activateur ou répresseur sur l'expression d'un gène (pour une revue (*Sauer et Tjian, 1997*)). À l'opposé, quelques facteurs sont connus pour leur caractère spécifiquement répressif.

Le facteur Mot1p (Modifier Of Transcription 1, BTAF1 chez *H. sapiens*) peut être considéré comme un TAF, car il se lie à TBP, mais indépendamment de TFIID. À lui seul, il a un effet globalement répressif sur la transcription, parce qu'il limite la quantité de TBP disponible (*Pugh, 2000*). Cependant, Mot1p est aussi présent sur les promoteurs de gènes actifs (*Andrau et al., 2002*). Son action paraît dépendre du promoteur, et offre ainsi un mécanisme d'initiation de la transcription indépendant de TFIID (*Gumbs et al., 2003*).

L'hétérodimère NC2 (α et β) limite la formation du PIC en se liant à TBP. Il n'empêche pas son recrutement sur la boîte TATA, mais limite la formation du PIC, en gênant l'interaction de TBP avec TFIIA (*Xie et al., 2000*). Cet effet répressif sur le niveau de transcription basale semble indispensable, car la délétion du gène de l'homologue de levure de NC2 est létale.

Par ailleurs, le complexe NOT fonctionne de façon similaire, car une fois lié à TBP il prévient la formation du PIC. Son rôle semble donc être la limitation globale de la transcription de base, en particulier celle qui dépend des promoteurs dépourvus de boîte TATA (*Oberholzer et Collart, 1999*).

Enfin, le complexe NuRD réduit l'initiation de la transcription sur un promoteur à la fois par son activité déacétylase et par sa capacité à déplacer les nucléosomes (*Bowen et al., 2004*). Ceci illustre le fait que le remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP peut avoir un effet positif ou négatif sur la transcription. Le choix de l'un ou de l'autre est dirigé par les facteurs qui entourent les différentes Hélicase/Atpases des complexes de remodelage.

vii. Un exemple d'intégration du signal et de régulation de l'expression génétique : la transcription soumise aux récepteurs nucléaires.

Une classe de facteurs de transcription a très tôt retenu l'attention des biochimistes, car ils constituaient un lien fonctionnel entre les hormones stéroïdes, qui transmettent des signaux extracellulaires et la régulation de l'expression des gènes, au sein du noyau. Ces facteurs sont les récepteurs nucléaires, protéines spécifiques aux métazoaires se liant à l'ADN sur certains promoteurs, et capables de réguler la transcription à partir de ces promoteurs. Leur activité positive ou négative est régulée par la présence de leurs ligands respectifs. Ces ligands sont des molécules lipophiles, hormones ou métabolites, qui circulent dans la matrice extracellulaire, mais peuvent aussi entrer dans la cellule.

Les récepteurs nucléaires forment une large famille définie par une structure commune : ils possèdent un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine d'interaction avec le ligand (LBD). Au sein de ces deux régions ont été définis 2 domaines importants pour la fonction du récepteur, AF1 et AF2 (Activation Function 1 et 2). Les études structurales des NR sont nombreuses et ont montré que l'organisation spatiale intramoléculaire des différents domaines change avec l'état actif ou inactif de la protéine.

L'existence des récepteurs nucléaires pose une question fondamentale pour la compréhension de l'initiation de la transcription : comment l'événement « recrutement d'un NR sur l'élément de réponse (Hormone Response Element : HRE) d'un promoteur » se transforme spécifiquement en « activation/répression de l'expression du gène » ?? Ce processus fait intervenir des co-facteurs organisés en complexes multi-protéiques, décrit ci-dessus. Ils préparent le promoteur et son environnement, puis probablement recrutent et facilitent l'organisation des facteurs généraux de la transcription autour du site d'initiation (*Glass et Rosenfeld, 2000*). Cependant, les mécanismes de co-activation par les NR sont nombreux et de natures très différentes, et peuvent se combiner pour la régulation d'un même gène. Ils participent ainsi pour une grande part à la régulation fine et spécifique de l'activation de la transcription.

La régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires intervient dans une large gamme de processus biologiques. Sans prétention à l'exhaustivité, notons par exemple que RXR et RAR jouent un rôle crucial dans le développement embryonnaire car ils contrôlent d'induction des gènes Hox, en fonction de la présence de leurs ligands, des métabolites de la vitamine A (acides rétinoïques cis et all-trans) (*Mark et al., 1999*). De façon différente, un ensemble de récepteurs aux acides gras (PPAR, FXR...) régule de manière transversale le métabolisme des lipides extracellulaires (*Chawla et al., 2001*).

Des interactions des NR avec les différents co-activateurs de la transcription ont déjà été évoquées dans ce paragraphe. Je reviendrais sur quelques aspects de cette régulation à propos du facteur Tra1/TRRAP qui est une cible privilégiée des NR.

INTRODUCTION CHAPITRE 2 :

LES COMPLEXES « HISTONES ACÉTYLTRANSFERASES »

Le lien entre acétylation des histones et régulation de l'initiation de la transcription est aujourd'hui admis et avéré (pour une revue (*Brown et al., 2000*)). De très nombreux travaux tendent depuis cette découverte à révéler les mécanismes permettant la régulation extrêmement fine de l'état de modification des histones. Ils ont aussi ouvert d'autres champs d'investigation. Ainsi, il est devenu évident que les Histones Acétyltransférases (HAT) modifient aussi des protéines non histone (*Sterner et al., 1999*), et que ces modifications régulent en plus de la transcription, la réparation et la réplication de l'ADN.

I. Les enzymes Histone acetyltransferase (HAT) :

Suivant leur localisation subcellulaire et leur fonction, les enzymes capables de transférer un groupement acétyl aux résidus lysines et arginines des histones ont été classées en deux groupes : les enzymes cytoplasmiques (type B), et les enzymes nucléaires (type A).

Le mécanisme d'acétylation est commun à toutes : le groupement acétyl transféré sur la fonction amine en position ϵ d'un résidu lysine ou arginine provient de l'acétyl-CoA qui se lie aux HAT sur un domaine de reconnaissance (domaine AT). De séquence Arg/Gln-X-X-Gly-X-gly/Ala, ce domaine est le seul commun à toutes les HAT de type A et B.

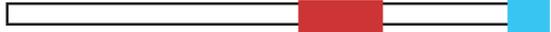
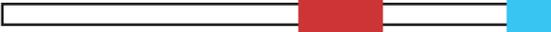
a. Enzymes cytoplasmiques :

Les HAT de type B catalysent l'acétylation, dans le cytoplasme, des histones nouvellement synthétisés à intégrer à l'ADN au cours de la réplication. La première identifiée fut HAT1 chez la levure (*Parthun et al., 1996*), qui avec Hat2, Rabp46/48, et CAF1 forme un complexe capable de modifier des lysines spécifiques d'H4 (*Roth et al., 2001*).

À ce jour, aucune implication fonctionnelle d'HAT1 dans l'assemblage de la chromatine néo-synthétisée n'a cependant été prouvée *in vivo*. De plus, la restriction supposée d'HAT1 aux histones du cytoplasme a été remise en cause récemment par plusieurs nouveaux résultats : elle n'est pas spécifiquement cytoplasmique, du moins chez la levure (*Poveda et al., 2004*) et semble participer, en modifiant l'histone H3, à la répression des séquences télomériques (*Kelly et al., 2000*), et à la réparation des cassures double brin de l'ADN (*Qin et Parthun, 2002*) (cf. paragraphe III de ce chapitre et chapitre IV).

b. Enzymes nucléaires :

Les HAT de type A ont été groupées en famille selon qu'elles contiennent des Bromodomaines, Chromodomaines, ou domaines doigts de zinc spécifiques, sans que

	H2A	H2B	H3	H4	DOMAINES	Autres substrats
scHAT1				K5 K12		
scELP3			X	X		
scGCN5		X	K14 K18	X		
hsGCN5		X	K14	X		c-Myc, Tat(HIV1), HMG2 ?
mPCAF			K14			c-Myc, E2F1, HMG1(Y), TFIIIF, TFIIIEb
HsPCAF			K14			idem

 Bromodomaine  Domaines Acétyltransférase

Figure 6 : **Représentation schématique des HAT de la famille GNAT** les plus connues.

Les substrats d'acétylation préférentiels des HAT sont donnés par un X, si le site précis n'est pas déterminé, par le numéro de la lysine si elle est connue. La colonne centrale donne la position du domaine acétyltransférase (en rouge) et du bromodomaine (en bleu) s'il y a lieu. La dernière colonne résume les substrats non histone de ces HAT, identifiés jusqu'ici.

des substrats précis ou des fonctions spécifiques puissent leurs être attribués pour le moment.

i. Famille GNAT

Cette super famille de 10000 protéines ne se limite pas aux acétyltransférases spécifiques des histones. Elle comprend toutes les protéines capables de transférer un groupement acétyl sur un atome d'azote à partir d'acétyl-coA, et ayant en commun un motif d'une centaine d'acides aminés très conservés (motif AT), homologue au domaine catalytique de yGcn5. Ce domaine AT a une structure tri-dimensionnelle conservée organisée de façon identique dans la quinzaine de GNAT cristallisée jusqu'à ce jour (pour une revue (*Vetting et al., 2005*)). La première GNAT spécifique des histones, p55, fut décrite chez *Tetrahymena* (*Brownell et al., 1996*), et son homologie avec le facteur de transcription yGcn5 fut la première preuve d'un lien biologique entre activation de la transcription et acétylation des histones. Je ne détaillerais ici que les travaux portants sur les GNAT liées à la transcription ou la réparation de l'ADN (**Figure 6**).

1. Gcn5

yGCN5 (« General Control of amiNo acid synthesis protein 5 like 2 ») a des homologues connus chez de très nombreuses espèces, de *Plasmodium Falciparum* (*Fan et al., 2004a*) à *H. sapiens*. Tous possèdent un domaine d'acétylation AT très conservé, et un Bromodomaine dans la partie carboxy-terminale (*Sterner et Berger, 2000*). L'homologue humain diffère des autres espèces par une large extension amino-terminale, absente des premiers clones ADNc de *hsGcn5*. On a longtemps supposé que cette forme longue était le fruit d'un épissage alternatif, mais une erreur lors du clonage initial est plus probable, car la forme courte de *hsGcn5* n'a jamais été détectée *in vivo*. *ScGCN5* seul ou au sein d'un complexe multiprotéique acétyle H2B et H3, avec une préférence pour la Lysine 14 d'H3 (*Kuo et al., 1996*).

La délétion par KO de *gcn5* chez *S. cerevisiae* n'entraîne qu'un léger défaut de croissance. Mais, combinée à la délétion des queues d'histones H3 et H4, elle devient létale tandis qu'une accumulation des cellules en phase G₂/M est observée (*Zhang et al., 1998*). Une explication de ce phénotype pourrait venir de l'étude menée par Huisinga et al : ils montrent que GCN5 participe à la régulation de la transcription de 60 % du génome, mais ceci de façon apparemment indépendante de son activité HAT (*Huisinga et Pugh, 2004*). Ainsi, le double KO de *gcn5* et des queues d'histone est plus grave que l'un séparé de l'autre, car l'enzyme possède une fonction indépendante de son activité d'acétylation.

Par ailleurs, le bromodomaine de Gcn5 est utile à l'activité HAT : un mutant qui en est dépourvu s'intègre à SAGA mais est beaucoup moins efficace pour acétyler les nucléosomes (*Sterner et al., 1999*).

2. Pcaf

Pcaf (p300/CBP associated factor) est une protéine spécifique aux mammifères, et identique à Gcn5 à 70%. Elle acétyle les mêmes substrats. Ceci pose de façon évidente la question de la redondance de ces deux enzymes. De plus, le KO de *pcaf* chez la souris n'entraîne pas de phénotype notable, laissant supposé que ses fonctions peuvent être en grande partie prises en charge par Gcn5 (*Yamauchi et al., 2000*). Cependant le double KO montre un phénotype plus sévère, au stade embryonnaire, que celui de *gcn5*

	H2A	H2B	H3	H4	DOMAINES	Autres substrats
Sc Sas2						
Sc Sas3			X	X		
Sc Esa1	K4 K7			K14		
Hs Tip60p	K5		K14	K5 K12		c-Myc, UBF, AR, p53
Dm MOF				K16		
Hs MOF				K16		
Hs MOZ		?				AML1
Hs MORF		?				
Mm Querkopf		?				
Hs HBO1			X			

	Chromodomaine		Domaines Acétyltransférase + Doigt de zinc C2HC
	Domaine PHD		Domaine Doigt de zinc

Figure 7 : **Représentation schématique des HAT de la famille MYST.**

Chaque enzyme est présentée avec ses sites d'acétylation préférentiels sur les 4 histones, puis la position des différents domaines colorés selon la légende données. La dernière colonne résume les substrats non histone de ces HAT, identifiés jusqu'ici.

seul, (Xu et al., 2000). Pcaf a donc très probablement une (des) fonction(s) spécifiques au cours du développement. La répartition des rôles entre Gcn5 et Pcaf pourrait dépendre de la disponibilité de leur combustible commun l'acétyl-coA, par exemple. Il est intéressant de noter que Pcaf a une affinité pour l'acétyl-CoA 10 fois supérieure à celle de Gcn5. La prédominance de l'une sur l'autre face à une même position à acétyler peut donc dépendre de la concentration locale d'acétyl-CoA, ou le rapport Acétyl-CoA / CoA (Tanner et al., 2000a ; Tanner et al., 2000b).

3. Elp3

Elp3 est conservée chez les eukaryotes et possède les caractéristiques d'une GNAT (Wittschieben et al., 1999). Elle est la plus petite des trois sous-unités qui forment, avec l'ARN pol II, le complexe d'élongation de *S. cerevisiae*. Son activité *in vivo* semble plus particulièrement dirigée vers H3 et H4 (Winkler et al., 2002). Une hypothèse séduisante serait alors que l'acétylation d'H3 et H4 par Elp3 facilite la progression du complexe d'élongation sur le gène en modifiant l'affinité de l'octamère d'histone pour l'ADN. Aucune donnée ne vient soutenir cette idée à ce jour, et la seule indication fonctionnelle concernant Elp3 en fait un point d'ancrage pour l'ARN synthétisé par l'ARN polymérase II (Petrakis et al., 2004).

4. Autres

Enfin, deux enzymes HAT plus récemment découvertes pourraient aussi intervenir directement dans la régulation transcriptionnelle : de la protéine *scHpa2*, on ne connaît que la structure (Angus-Hill et al., 1999). D'autre part, hALP est connue pour son effet activateur sur la transcription du gène de hTERT, la sous-unité catalytique de la télomérase (Lv et al., 2003).

ii. Famille Myst :

Une représentation schématique des HAT de type MYST les plus étudiées est donné par la **Figure 7**.

La translocation génétique responsable de certaines AML (acute myeloid leukaemia) a été identifiée comme une fusion entre CBP et la protéine MOZ (Borrow et al., 1996). La similarité de cette dernière avec des acétyltransférases connues a conduit à créer une famille de HAT, MYST (Moz, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60p). Elles ont en commun un domaine central, comprenant le site AT de liaison à l'acétyl-coA accolé à un motif doigt de zinc dit C2HC (de séquence C-X₂-C-X₁₃-H-X-C) (pour une revue (Utley et Cote, 2003)). Ce dernier les distingue des HAT GNAT.

Cette famille comprend Esa1 identifié chez *S. cerevisiae*, et ses homologues nommé Tip60p, chez *M. musculus* (McAllister et al., 2002), *H. sapiens* (Doyon et al., 2004), *C. elegans* (Ceol et Horvitz, 2004), *D. melanogaster* (Kusch et al., 2004), mais aussi dMOF, hMOF, Sas2 et Sas3/Ybf2 (homologue de MOZ), MORF et Hbo1.

La famille MYST partage avec les GNAT le domaine AT central comprenant le site de liaison de l'acétyl-coA. La résolution de la structure d'Esa1 a montré de plus que cette région s'organise dans l'espace de façon très similaire au domaine catalytique des GNAT (Yan et al., 2000). En revanche, les parties carboxy- et amino-terminale des MYST diffèrent, ce qui explique leur affinité pour des substrats différents. De plus, certaines MYST sont dotées de chromodomaines, et d'autres d'un domaine « doigts de zinc » supplémentaire dit PHD (« Plant HoméoDomain »), ce qui permet de distinguer deux sous groupes (**Figure 7**).

1. Esa1

Esa1 acétyle préférentiellement l'histone H4, en particulier les positions K5 et K8, mais aussi les lysines K4 et K7 de l'histone H2A, et la lysine K14 de l'histone H3 *in vitro*. Cette spécificité est retrouvée au sein du complexe NuA4, dont Esa1 est l'enzyme acétyltransférase (Allard *et al.*, 1999). Elle semble, à ce jour, être la seule histone acétyltransférase essentielle chez *S. cerevisiae* (Clarke *et al.*, 1999). En effet, une mutation dans le domaine acétyltransférase, qui entraîne une perte de l'activité HAT, est létale. Il semble que ce phénotype soit lié à un défaut de formation des fuseaux mitotiques, et de migration du noyau entre la cellule mère et la cellule fille. Esa1 participerait donc par son activité d'acétylation au bon déroulement de la mitose. Il est aussi intéressant de noter que le blocage en mitose des mutants *esa1* résulte de l'activation du point de contrôle dépendant de Rad9, normalement activé par les dommages de l'ADN.

Cette dernière observation est en accord avec les récents travaux de Bird *et al.*, montrant une sensibilité anormale des mutants *esa1* aux agents génotoxiques, en même temps qu'une diminution du nombre d'acétylations de H4 (Bird *et al.*, 2002). De plus, le complexe NuA4 paraît spécifiquement actif sur des sites de cassures de l'ADN, comme décrit au paragraphe III de ce chapitre, ce qui suggère qu'Esa1 soit une sous-unité fondamentale du complexe

Par ailleurs, dans un criblage des cibles physiologiques de l'HAT Esa1 par immunoprécipitation de chromatine (ChIP), une forte proportion de promoteurs de gènes codants pour des protéines ribosomales ont été retenus. Il semble donc qu'Esa1 soit plus spécifiquement recrutée sur ces promoteurs, et de façon dépendante du co-facteur de la transcription Rap1, spécifique des protéines ribosomales. Ainsi, son activité serait non essentielle à la transcription basale, mais serait particulièrement requise pour la transcription des sous-unités du ribosome, en réponse à un stimulus de croissance (Reid *et al.*, 2000). La délétion d'Esa1 entraîne néanmoins une diminution très importante de l'acétylation de H4 sur l'ensemble du génome, laissant supposer qu'elle est la principale enzyme modifiant H4, chez la levure.

2. Tip60p

a. Conservation structurale et fonctionnelle de Esa1 à Tip60p.

Tip60p a d'abord été identifié, chez l'homme, en interaction avec la protéine Tat du virus HIV-1 (Kamine *et al.*, 1996). Elle est l'homologue de la protéine de levure Esa1, avec qui elle partage de nombreuses caractéristiques : ses substrats de prédilections sont H4, H3 et H2A sous forme d'histones libres (Yamamoto *et Horikoshi*, 1997). Cependant, au sein du complexe TIP60 et sur des nucléosomes, son activité est limitée à H2A et H4 (Doyon *et al.*, 2004). Il a été montré récemment que l'activité HAT du complexe est essentielle à la signalisation d'un site de cassure double brin de l'ADN (DSB) (Kusch *et al.*, 2004). Cette fonction spécifique sera plus largement commentée au paragraphe III. Par ailleurs, Tip60p comme Esa1 participe plus particulièrement à l'activation de la transcription des gènes ribosomaux *in vivo*. En effet, le facteur de transcription UBF, spécifique des protéines du ribosome, est un substrat d'acétylation de Tip60p (Halkidou *et al.*, 2004).

Tip60p, à l'instar de p300/CBP, acétyle aussi de nombreux facteurs de transcription comme des récepteurs nucléaires et des activateurs ribosomiques, ou encore l'oncogène *c-myc* (Patel *et al.*, 2004). L'ubiquitine-ligase PIRH2, qui est liée à la dégradation de p53 et peut interagir avec Tip60p, pourrait être un autre candidat (Logan *et al.*, 2004).

Notons enfin que l'activité HAT de Tip60p est régulée par la phosphorylation de Sérines (Ser 86 et Ser90). La seconde est conservée chez les eucaryotes supérieurs mais absente d'Esa1, ce qui dénote déjà une évolution. La Ser90 est la cible de la kinase B/cdc2, impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire (Lemercier *et al.*, 2003).

b. Évolution fonctionnelle de Tip60p

À la différence d'Esal, Tip60p contient un motif LXXLL de reconnaissance des récepteurs nucléaires dans sa partie carboxy-terminal et interagit avec le récepteur aux androgènes (AR) (*Brady et al., 1999*). De façon dépendante de son motif LXXLL, elle participe à la co-activation de la transcription soumise à ce récepteur nucléaire, et à d'autres NR de classe I (ER α , ER β et GR), mais pas de classe II. À la différence d'autres co-activateurs des NR pourvu d'une seule boîte LXXLL, TIP60p ne s'homodimérise pas pour lier un récepteur nucléaire (*Gaughan et al., 2001*). Dans le cas du récepteur aux androgènes au moins, cette activation dépend de son acétylation par Tip60p (*Gaughan et al., 2002*), et est contrecarrée par HDAC1 qui déacétyle AR (*Gaughan et al., 2005*). L'ensemble de ces données fait de Tip60p un cofacteur essentiel de la régulation par AR, dont l'importance physiologique a été mise au jour récemment dans le cancer de la prostate (*Halkidou et al., 2003*). Cependant, rien ne permet de dire si l'enzyme Tip60p agit ici seul, ou au sein du complexe multi-protéique TIP60, doté de multiples activités liées à la transcription.

Tip60p régule aussi l'activité de p53. Il partage avec ce maillon essentiel de la régulation du cycle cellulaire plusieurs caractéristiques : il est activé en cas d'irradiation UV, et son activité est régulée par l'ubiquitinase Mdm2 qui déclenche sa dégradation par le protéasome. De façon plus précise, il semble que Tip60p soit un co-activateur de p53 en cas de lésion de l'ADN, et, dans une cellule non stressée, le protège de la dégradation par le protéasome. Ceci laisse supposer une participation coordonnée et symbiotique des deux facteurs à la réponse dépendante de p53 (*Legube et al., 2002 ; Legube et al., 2004*).

Dans leur ensemble, ces données placent Tip60p au centre d'un réseau de régulation complexe, où il relie l'acétylation des histones à la régulation des gènes soumis aux régulateurs du cycle cellulaire tels p53 et c-myc. Cette fonction semble nécessaire dès les premiers stades du développement embryonnaire, comme cela a été observé chez des embryons de poulet (*Lough, 2002*).

c. Rôle de Tip60p dans des mécanismes transcriptionnels spécifiques

Tip60p et dérégulation transcriptionnelle liée aux syndromes neurodégénératif :

Il a été montré récemment que la protéine Tip60p interagit avec AICD (« APP intracellular domain »), l'un des produits du clivage par une sécrétase de la β -APP (Amyloid Precursor Protein) (*Cao et Sudhof, 2001*). APP est une protéine transmembranaire, dont le clivage produit des peptides sécrétés dans la matrice extracellulaire, et impliqués dans les maladies neurodégénératives. Un rôle transcriptionnel est supposé depuis longtemps pour AICD, l'autre produit qui reste cytoplasmique. Il a été confirmé récemment par l'observation du recrutement de Tip60p et AICD sur le promoteur d'un gène régulé par NF κ -B (*Baek et al., 2002*).

Dans ce contexte, soulignons que l'activation de la transcription dépendante de NF κ -B est soumise à l'action d'une interleukine (ou cytokine IL-1 β), et que Tip60p interagit avec certaines d'entre elles (*Sliva et al., 1999*). Étonnamment, l'intégrité du domaine HAT de Tip60p est essentielle à la formation de ce complexe AICD/Tip60, à son recrutement sur le promoteur, et donc très probablement à la trans-activation du gène. Rien ne permet de savoir à ce jour si dans ce cas Tip60p intervient seule ou en complexe. En effet, ses partenaires habituels n'ont pas été identifiés dans les différents criblages double-hybride menés dans les travaux cités ci-dessus. Par ailleurs, les derniers avancements sur ce sujet suggèrent que Tip60p agisse en collaboration avec le facteur d'assemblage des nucléosomes SET, probablement pour ouvrir la chromatine (*Telese et al., 2005*).

De façon étonnante, la liaison de Tip60p au facteur de transcription CREB (cAMP Response Element Binding Protein) inhibe l'activation due à ce facteur (*Gavaravarapu et Kamine, 2000*), et ceci indépendamment de son domaine AT. Cependant, cette description d'un rôle inhibiteur de Tip60p est unique et ne repose que sur l'effet observé après surexpressions *in vivo* des différents acteurs.

La fonction de l'HAT Tip60p est donc assez homogène : à une exception près, elle a toujours été associée à un processus nécessitant l'ouverture de la chromatine, dépendant de sa capacité à acétyler des protéines. Mais cette fonction est régulée par les partenaires variés auxquels Tip60p s'associe, suivant le contexte cellulaire (cycle cellulaire, stress, apoptose, etc...)

d. La protéine Tip60p n'est pas unique chez l'homme.

Il est probable que plusieurs ARN messagers soient produits par épissage alternatif à partir du gène codant pour Tip60p. A ce jour, trois formes différentes de la protéine ont été détectées : Tip60p, sur laquelle porte le paragraphe précédent, une forme plus longue identifiée *in vivo*, mais très peu étudiée (Legube et Trouche, 2003), et PLIP.

Le variant PLIP (PLA₂ Interacting Protein) ou Tip60pb est, lui, mieux caractérisé : cette forme plus courte est dépourvue d'une séquence de 52 acides aminés, où se lient de nombreux facteurs comme CREB et Tat de HIV1, et qui semble même essentielle à l'activité HAT de Tip60p (Gavaravarapu et Kamine, 2000). Malgré cela, au sein d'un complexe purifié, PLIP est doté d'une activité HAT similaire à Tip60p (Doyon et al., 2004). Il est impliqué dans l'activation de prostaglandines par la phospholipase A₂, laissant supposer une fonction très éloignée de Tip60p (Ran et Pereira-Smith, 2000 ; Sheridan et al., 2001).

3. Sas3/ybf2

Sas3/Ybf2 est l'homologue chez la levure de *hsMOZ*, et la sous-unité catalytique de NuA3, complexe HAT spécifique d'H3 (John et al., 2000). Identifié dans un premier temps comme facteur empêchant la répression des loci HMR de levure, Sas3 (Something About Silencing) peut aussi avoir un effet négatif sur la transcription de certains gènes. Son activité enzymatique au sein de NuA3 est dépendante de la sous-unité Yng1 qui permet la liaison au nucléosome (Howe et al., 2002). Sas3 par son activité HAT pourrait faire partie d'un ensemble de facteurs faisant barrière à la répression globale de tous les loci, comme le montre une étude des facteurs de remodelage et de modification de la chromatine participant à la délimitation de domaines actifs et inactifs (Oki et al., 2004 ; Osada et al., 2001).

4. MOF

MOF, chez la drosophile, participe au mécanisme de compensation de dosage (Hilfiker et al., 1997), au sein du complexe MSL (Male Specific Lethal) qui se lie tout le long du chromosome X mâle, et génère un état hyperactif (Smith et al., 2000). Ce mécanisme permet de compenser l'absence d'un chromosome homologue, comme chez la femelle. Cette activation globale de la transcription est dépendante de l'acétylation par MOF de la lysine K16 de l'histone H4 (Akhtar et Becker, 2000). Le domaine doigt de zinc C2HC commun aux HAT MYST trouve ici une fonction potentielle, puisqu'il semble reconnaître la partie structurée du nucléosome, et permet le recrutement de MSL sur le site à acétyler (Morales et al., 2004). Il est à noter qu'un homologue humain de MOF, appartenant aussi à la famille MYST, a été caractérisé (Neal et al., 2000), laissant supposer que la compensation de dosage sur les autosomes existe aussi chez les mammifères.

5. MOZ

Le gène MOZ est sensible aux translocations et fréquemment retrouvé fusionné à d'autres HAT (Tif2, CBP/p300...) dans des cas de leucémie myéloïde aigüe (AML) (Borrow et al., 1996). Son activité HAT *in vitro* sur les histones H3 et H4 n'a été démontrée que récemment (Champagne et al., 2001).

6. MORF

MORF (*Champagne et al., 1999*) est une HAT d'origine humaine similaire à MOZ autant par sa séquence que par ses caractéristiques fonctionnelles : une fusion du gène MORF avec celui de CBP a été détectée dans certaines AML en particulier. L'une comme l'autre possède un domaine amino-terminal comprenant deux motifs doigt de zinc PHD apparemment répressif pour la transcription activée par GAL4.

7. Hbo1

Hbo1 se distingue dans la famille MYST : elle possède un motif canonique doigt de zinc supplémentaire, et fut isolée en premier lieu comme partenaire du complexe qui se forme aux origines de réplication de l'ADN (*Iizuka et Stillman, 1999*). Son activité HAT sur l'histone H3 n'a pu être démontré que pour la protéine endogène, probablement entourée de ses partenaires. Certaines données suggèrent que l'activité HAT de Hbo1 serait importante pour la réplication de l'ADN.

iii. Autres :

1. TAF1

Le facteur TAF1 est, lui aussi, une Histone Acétyltransférase possédant le domaine AT caractéristique (cf chapitre 1). Il est intéressant d'ajouter ici que son domaine HAT, situé dans la partie centrale et conservée de la protéine, est très peu semblable aux domaines AT connus chez les autres GNAT et les MYST.

2. ACTR, SRC1 et TIF2

Une autre classe d'HAT est apparue avec l'étude poussée de la régulation de l'expression génique par les récepteurs nucléaires (pour une revue (*Sterner et Berger, 2000*)). Comme nous l'avons vu, les NR sont des substrats d'acétylation ((*Fu et al., 2004*) et références incluses), et les co-facteurs de la transcription ACTR, SRC1 et TIF2 semblent être des HAT qui leur sont spécifiques. Ils forment un groupe très homogène, du point de vue structural et fonctionnel : leurs domaines HAT respectifs se ressemblent, et sont spécifiques d'H3 et H4. Ils interagissent avec différents récepteurs nucléaires, tels PR (Progesterone Receptor), GR (Glucocorticoid Receptor), ER, TR et RXR. Par ailleurs, leurs fonctions semblent intimement liées puisque SRC1 et TIF2 sont acétylés par CBP (*Chen et al., 1997*), et tous les trois interagissent avec CBP/p300 (*Smith et al., 1996*).

L'existence d'HAT spécifiques des NR, ainsi que des résultats récents décrivant le rôle d'autres HAT (Tip60p, p300, PCAF) dans la transcription activées par les NR, démontrent l'importance de l'acétylation des histones dans ce processus. Ils soulignent aussi la diversité nécessaire des mécanismes d'acétylation qui participent à la régulation fine de l'activité du génome.

3. p300/CBP

p300 et CBP (CREB Binding Protein) sont deux HAT ayant des homologues chez de nombreux métazoaires, mais non identifiées chez les eucaryotes inférieurs comme la levure. Leurs séquences d'acides aminés sont identiques à 63 % (*Arany et al., 1995*) et partagent une organisation en domaines bien caractérisée (pour une revue (*Kalkhoven, 2004*)).

Ces deux protéines dotées d'activité HAT ont pourtant été identifiées par des voies différentes : la première en interaction avec l'oncogène E1A, la seconde comme co-activateur du facteur de transcription CREB. Cependant, dans ces deux fonctions comme dans de nombreuses autres (co-activation de facteurs de transcription, sensibilité à l'inhibiteur d'acétyltransférase LysCoA (*Goodman et Smolik, 2000 ; Vo et Goodman, 2001*)), leurs rôles semblent identiques. Parmi les nombreux sites potentiels d'acétylation des

queues d'histones, p300/CBP semble avoir *in vitro* une préférence commune pour les lysines K12 et K15 de H2B, K14 et K18 d'H3, K5 et K8 de H4 (Schiltz *et al.*, 1999).

Elles sont régulées par des événements de phosphorylation dont elles sont les cibles. Cependant, seul un site de phosphorylation répresseur a pu être confirmé *in vivo*. Certains autres sites décrits semblent spécifiques de chacune des deux protéines, et pourraient expliquer leurs quelques différences fonctionnelles (Kalkhoven, 2004).

D'une part, quelques travaux suggèrent en effet des fonctions uniques à CBP et p300. La réaction de cellules MCF7 aux radiations ionisantes par exemple, est dépendante de p300 mais pas de CBP (Yuan *et al.*, 1999).

D'autre part, les phénotypes de KO chez la souris des gènes *p300* ou *cbp* ne se caractérisent pas par les mêmes déficiences. Les embryons de souris *p300*^{-/-} souffrent de malformations cardiaques inexistantes chez les souris *cbp*^{-/-}, tandis qu'un retard de croissance est spécifique aux hétérozygotes *cbp*^{+/-} par rapport aux hétérozygotes *p300*^{+/-}. Les explications mécanistiques de ces phénomènes ne sont pas connues à ce jour, mais on suppose qu'ils mettent en jeu des voies de régulation spécifiques. Ainsi, p300, à la différence de CBP, est capable d'acétyler le complexe TAC dit « TBP sans TAF », (Mitsiou *et Stunnenberg*, 2000 ; Mitsiou *et Stunnenberg*, 2003), Smad7, un régulateur de la signalisation par TGF- β (Gronroos *et al.*, 2002), et le facteur de transcription p73 (Costanzo *et al.*, 2002). Ces spécificités de substrats expliquent potentiellement les effets des expériences décrites ci-dessous. Il est possible en effet que ces deux enzymes si ressemblantes soient recrutées pour des rôles différents par le biais de phosphorylations spécifiques, autorisant ou interdisant certaines interactions protéines-protéines.

II. Les complexes GNAT ou SAGA-like : SAGA, SLIK, PCAF, STAGA, TFTC

Gcn5, Pcaf, p300, TAF250 ont été très largement étudiés pour leur capacité à acétyler autant les histones que d'autres substrats. Lors de purification à partir de matériel endogène, ces facteurs n'apparaissent jamais seuls, et les premiers tests de fonction *in vitro* ont montré qu'ils ne fonctionnaient correctement qu'entourés d'autres facteurs, c'est-à-dire en complexes multi-protéiques. Ces partenaires primordiaux confèrent une plus grande stabilité, une meilleure spécificité à l'enzyme, ou la dirigent vers certains sites du génome. Ainsi, *scGcn5* est inactive sur de l'ADN chromatinisé si elle est isolée (Kuo *et al.*, 1996). Néanmoins, la présence d'ADA2 et ADA3 lui permet d'acétyler des histones organisés en nucléosome. Ces trois facteurs participent aux complexes de levure SAGA et SLIK, mais forment aussi une entité indépendante qui peut être purifiée (Balasubramanian *et al.*, 2002).

Parmi les complexes capables de modifier les queues amino-terminales des histones, et de réguler ainsi l'état plus ou moins actif de la chromatine, ce groupe de complexes se distingue par le fait qu'ils contiennent des TAFs. Ceux-ci forment, avec quelques autres facteurs, un noyau commun auquel s'ajoute dans chacun des complexes des sous-unités spécifiques. Leur enzyme HAT est Gcn5 ou Pcaf.

Deux complexes très proches sont connus chez la levure (SAGA et SLIK). Chez l'homme, trois complexes ont été isolés en peu de temps par des laboratoires différents. Ils sont très proches autant par leur composition que par leur fonction. Enfin, des informations partielles suggèrent l'existence d'un ou plusieurs complexes similaires chez *D. melanogaster* (Kusch *et al.*, 2003 ; Muratoglu *et al.*, 2003), ou chez *M. musculus*.

TFIID	sc SAGA	sc SLIK	dm SAGA	hs TF2C	hs PCAF	hs STAGA	Commentaires
TBP	/	/	/	/	/	/	
TAF1	/	/	/	/	/	/	
TAF2	/	?	dTAF2 ?	hTAF2			
TAF3	?	?	?	hTAF3	?	?	
TAF4	/	?	dTAF4 ?	hTAF4	?	/	HFD (TAF12)
TAF5	yTAF5	yTAF5	dTAF5 ?	hTAF5	?	/	
TAF6	yTAF6	yTAF6	dTAF6 ?	hTAF6	?	?	HFD (TAF9)
TAF7	?	?	?	hTAF7	?	/	
TAF8	?	?	?	hTAF8L	?	?	HFD (TAF10 ou Spt7)
TAF9	yTAF9	yTAF9	dTAF9 ?	hTAF9	hTaf9	hTaf9	HFD (TAF6 ou TAF6L)
TAF10	yTAF10	yTAF10	dTAF10b dTAF10a	hTAF10	hTaf10	hTaf10	HFD (TAF ou SPT7)
TAF11	/	/	/	/	/	/	
TAF12	yTAF12	yTAF12	dTAF12	hTAF12	hTaf12	hTaf12	HFD (TAF4 ou ADA1)
		?		hTAF6L	hTaf6L	hTaf6L	
	?	?		hTAF5L	hTaf5L	hTaf5L	
TAF13	/	/	/	/	/	/	
TAF14*	/	/	/	/	/	/	
TAF15**	/	/	/	/	/	/	
	Tra1	Tra1	dtra1	hTRRAP	hTRRAP	hTRRAP	cible des coactivateurs
	yGCN5	yGCN5	dGCN5	hGCN5L	hPCAF	hGCN5	HAT
	yADA1	yADA1	?	hADA1	?	hADA1	HFD(TAF12)
	yADA2	yADA2	(dADA2a) ?	?	hADA2a	hADA2a	doigts de zinc et SANT : régulation de l'HAT
	/	/	dADA2b	(hAdA2b) /	(hADA2b)/	(hADA2b)/	doigts de zinc et SANT : régulation de l'HAT
	yADA3	yADA3	dADA3	hADA3	hADA3	hADA3	régulation de l'HAT
	ySPT3	ySPT3	?	hSPT3	hSpt3	hSpt3	interaction avec TBP
	?	?		hSAP130		hSAP130	HFD
	ySPT7	ySPT7 tronqué	?	hSPT7L (STAF65g)		hSPT7L (STAF65g)	HFD (TAF10), bromodomain. Interaction génétique avec TBP
	ySPT8	/	?	?	?	?	
	ySPT20	ySPT20	?	?	?	?	interaction avec TBP
	Sgf73	?	?	Ataxin7	?	?	extention polyQ dans des ataxies spinocerebeleuses
	Sgf29	Sgf29	?	?	?	?	
	Ubp8	?	?	?	?	?	Ubiquitine ligase
	Sgf11	?	?	?	?	?	liaison de Ubp8
	?	Rtg2	?	?	?	?	
	Chd1	Chd1	?	?	?	?	
	Sus1		e(y)2 ?	e(y)2 ?	e(y)2 ?	e(y)2 ? STAF36 STAF46	export des ARNm

Figure 8 : **Composition et caractéristiques des complexes contenant des TAFs.**

Pour chaque complexe, la partie supérieure du tableau rassemblent les TAF, tandis que les autres sous-unités figurent dans la partie inférieure. Les protéines homologues sont sur une même ligne. / : l'absence de cette sous-unité ou de son homologue a été vérifiée ou est très probable. ? : la présence de cette sous-unité n'a pas été vérifiée ou est sujette à controverse. * : TAF14 n'est présent que chez la levure. ** : TAF15 n'est retrouvé que dans un sous-groupe de complexes TFIID humains. Les sous-unités marquées en vert représentent un noyau commun aux complexes de levure et de drosophile, de même que celles marquées en bleu pour les complexes humains. Dans la colonne Commentaires, la présence d'un domaine « histone fold » est signalée par l'acronyme HFD et par le nom du partenaire d'hétérodimérisation entre parenthèse.

a. Une base structurale commune

Je détaillerai ici les familles de sous-unités qui apparaissent dans les complexes SAGA-like connus aujourd'hui (pour une vision d'ensemble, cf. **Figure 8**). La fin du paragraphe sera consacré aux données purement structurales avant de s'intéresser aux avancées récentes sur les complexes de levure. La dernière partie (paragraphe II.c) donne un aperçu des similarités et différences de complexes humaines TFTC, STAGA et PCAF.

Par ailleurs, de nombreuses données ont été rassemblées récemment dans les références suivantes ((Carozza *et al.*, 2003 ; Roth *et al.*, 2001)).

i. Les familles de sous-unités conservées :

1. HAT de type Gcn5 :

La sous-unité enzymatique HAT est la protéine Gcn5, dans le cas de SAGA, STAGA et TFTC. PcaF (P300/Cbp Associated Factor) est celle du complexe du même nom (noté PCAF). Leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles sont décrites en détail au paragraphe I.b.i de ce chapitre.

Gcn5, isolée *in vitro*, autant chez la levure que chez les métazoaires, n'est pas capable d'acétyler les nucléosomes (Kuo *et al.*, 1996). Pcaf est, lui, un peu plus efficace, mais nettement moins que sur des histones libres (Yang *et al.*, 1996). Les facteurs qui entourent les HAT jouent donc un rôle primordial dans la spécificité de l'acétylation.

2. TAFs :

Les TAFs présents dans SAGA et TFTC (TAF5, TAF6, TAF9, TAF10 et TAF12) peuvent être détectés dans SAGA à des positions similaires à celles qu'ils occupent dans TFIID (Wu *et al.*, 2004). La zone qu'ils entourent, entre les lobes II, III et IV de SAGA, est superposable avec la partie interne de la pince de TFIID. Ainsi, les TAFs forment probablement une charpente qui structure le complexe. Par ailleurs, leurs positions sont compatibles avec la formation d'hétérodimères avec leurs partenaires HFD respectifs, SPT7 pour TAF10, ADA1 pour TAF12, et TAF6 avec TAF9.

En effet, cette fonction structurale est confirmée par les résultats de mutations du gène de *taf10* chez *S. cerevisiae*. L'introduction de certaines mutations de *taf10* sensible à une température non permissive (mutant *ts*) désorganise fondamentalement la structure du complexe, au point que la plupart des sous-unités de SAGA sont absentes d'une IP anti-*scTAF10* (Kirschner *et al.*, 2002).

Chez les mammifères, les complexes GNAT contiennent aussi des paralogues de TAF5 et TAF6, nommé TAF5L et TAF6L, dont la fonction n'est pas déterminée.

3. ADA, ou « Adaptor of transcription » :

Ces protéines caractérisées originellement chez la levure participent à la régulation de la transcription (Berger *et al.*, 1992). Elles ont été appelées Adapteur car leur fonction consiste, chez cet organisme, à créer un lien physique entre un activateur lié à une séquence distale du promoteur (UAS), et la machinerie de transcription. Les ADA se répartissent dans au moins deux types de complexes multi-protéiques, certains de grande taille, SAGA/TFTC, et d'autres de plus petite taille, les complexes ADA (Eberharter *et al.*, 1999).

Les facteurs ADA pourraient être au sein du complexe SAGA la cible de récepteurs nucléaires, comme TR, afin d'amener le complexe sur un promoteur à activer (Anafi *et al.*, 2000). Mais ce rôle ne serait pas conservé chez les eucaryotes supérieurs (Benecke *et al.*, 2002).

ADA1 :

La délétion du gène *ada1* chez la levure empêche la formation de SAGA (Sterner et al., 1999), mais elle ne gêne pas l'interaction existant entre Gcn5, ADA2 et ADA3. Par ailleurs, ADA1 contient un HFD et forme un hétérodimère avec TAF12 (Gangloff et al., 2000).

ADA2 :

Deux formes d'ADA2 existent chez toutes les espèces étudiées, mise à part la levure. Elles se répartissent dans deux familles distinctes sur un arbre phylogénique (Kusch et al., 2003) et ne semblent pas intervenir dans les mêmes complexes HAT. *DmADA2A* et *dmADA2b* participent toutes deux à des structures de type SAGA et interagissent avec Gcn5 dans un criblage double hybride, mais la première ne reconnaît pas ADA3 (Muratoglu et al., 2003). Une étude concomitante et très similaire soutient que la protéine ADA2a de *D. melanogaster* participe à un complexe indépendant de Gcn5 et inconnu pour le moment (Kusch et al., 2003). Le consensus semble être qu'une famille, ADA2b, participe au complexe de type SAGA chez la drosophile. À l'inverse, la forme ADA2b(β) humaine, au contraire de *hsADA2a(α)*, n'apparaît pas dans le complexe PCAF (Barlev et al., 2003) (voir la partie résultat III).

Quelques soient la famille ou l'espèce, ADA2 contient dans sa partie amino-terminale un domaine en doigt de zinc et un domaine SANT, très proches l'un de l'autre. Le dernier joue un rôle majeur dans l'activité HAT des complexes SAGA-like, car il stimule l'enzyme Gcn5, et participe à la reconnaissance de son substrat (Sterner et al., 1999). Ceci est confirmé par une étude récente chez *D. melanogaster*, où *dmADA2b* participe probablement à un complexe de type SAGA. En effet, le KO pour *dmADA2b* montre une réduction globale du niveau d'acétylation des queues d'histones H3, dès le stade larvaire où la protéine maternelle a disparu (Qi et al., 2004). Il semble par ailleurs que *dmADA2b* soit nécessaire à la régulation de l'apoptose dépendant de p53 en réponse aux radiations ionisantes.

ADA3 :

ADA3 ne fait pas partie des facteurs structuraux des complexes, mais régule l'activité HAT de Gcn5. Chez la levure, il constitue un co-activateur des récepteurs nucléaires RXRα, TRα et ERα avec qui il interagit directement (vom Baur et al., 1998). Cependant, la protéine homologue de *M. musculus* ne possède pas les motifs LxxLL qui permettent cette interaction. Ainsi, si *mADA3* et *hsADA3* sont aussi des co-facteurs des NR, c'est au sein de complexes de type SAGA ou ADA (Benecke et al., 2002).

4. SPT :

Cette classe de gènes a été créée suite à un test génétique chez la levure visant à identifier les protéines capables de compenser l'effet d'inhibition de la transcription consécutive à l'insertion d'un élément transposable Ty (SPT : suppressor of Ty) (Fassler et Winston, 1988). En font partie les gènes codant pour les histones H2A (*spt11*), H2B (*spt12*), et pour TBP (*spt15*), mais aussi 4 sous-unités de SAGA, SPT3, SPT7, SPT20 (ADA5) et SPT8.

SPT7 et SPT20:

SPT7 et SPT20 semblent être des composants centraux des complexes SAGA like, car les lignées de *S. cerevisiae* KO pour l'une ou l'autre ont un complexe SAGA décomposé (Sterner et al., 1999). Le KO de *spt7*, en particulier, rend SPT20 et ADA1 très sensibles à la dégradation, ce qui doit renforcer l'instabilité de l'ensemble (Wu et Winston, 2002). De plus, les souches $\Delta spt20$ et $\Delta spt7$ présentent une sensibilité aux radiations ionisantes anormales (Game et al., 2005).

La délétion du domaine HFD de SPT7, à l'extrémité carboxy-terminale, produit un phénotype similaire à celui d'un KO, portant à croire que l'hétérodimérisation est essentielle à la fonction de la

protéine dans SAGA. L'homologue humain de SPT7L (STAF65 γ , (Martinez et al., 2001)) est une protéine beaucoup plus courte, ne comprenant que la région HFD ainsi que la région du clivage dont résulte la forme courte présente dans SLIK.

La protéine SPT20 n'est connue que chez la levure, ce qui explique le peu de résultats la concernant. Deux explications peuvent être données à son absence actuelle des complexes humains. L'évolution peut avoir rendu sa présence inutile, d'une part. D'autre part, l'homologue de SPT20 chez les eucaryotes supérieurs a évolué très différemment, et ne ressemble plus à la forme de levure, ce qui rend son identification difficile.

SPT8 et SPT3 :

Au contraire des KO de *spt20* et *ada1*, les souches de levures $\Delta spt3$ et $\Delta spt8$ n'ont pas de phénotype très marqué (Stern et al., 1999), et le complexe SAGA qu'elles contiennent semble intègre (Wu et Winston, 2002). Cependant, toutes deux interagissent *in vitro* avec TBP (Larschan et Winston, 2001 ; Stern et al., 1999). SPT8 semble être la sous-unité d'interaction directe, puisqu'elle est indispensable à l'interaction de TBP avec SAGA. Néanmoins l'observation de recrutement *in vivo* sur des promoteurs dépendant de SAGA remet en cause cette affirmation : SPT3 semble en effet nécessaire au recrutement de TBP sur un plus grand nombre de promoteurs que SPT8 (Bhaumik et Green, 2001). Les deux protéines sont potentiellement complémentaires dans cette fonction.

Sa forte affinité pour TBP pourrait expliquer les effets contradictoires sur la transcription attribués à SPT8 *in vivo*. Ainsi, en l'absence d'un activateur, SPT8 est en compétition avec la partie amino-terminale de TFIIA pour la liaison à TBP, et limite alors la formation du PIC. À l'inverse, la présence d'un activateur autoriserait une coopération de SPT8 et TFIIA pour stabiliser TBP et favoriser la transcription (Warfield et al., 2004). Aucune étude ne permet de dire si SPT3 participe à ce mécanisme.

5. SAP130 :

SAP130 est un composé du complexe d'épissage associé au snrnp U2 (Das et al., 1999). Cette protéine a été identifiée par dégradation d'Edmann dans TFIC endogène purifié par immuno-précipitation (IP). Elle est retrouvée dans le complexe STAGA, purifié lui par IP anti-SPT3 (Martinez et al., 2001). Cependant, ces résultats doivent être

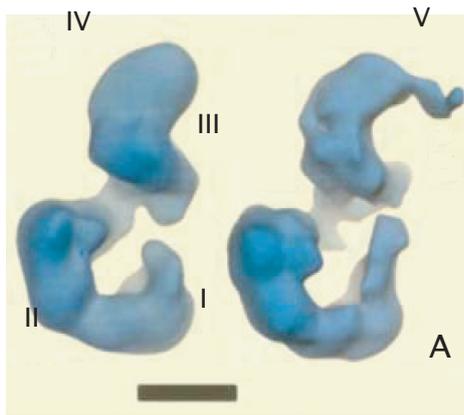


Figure 9A : **Modèle tridimensionnel de la structure de SAGA.**

Les cinq domaines structuraux sont numérotés. Deux modèles distincts sont présentés, le deuxième résultant du détachement du domaine V dans certaines conformations du complexe. La barre d'échelle représente 10 nm. Le sillon accessible au solvant est visible entre les domaines II et III. (adapté de (Wu, 2004)).

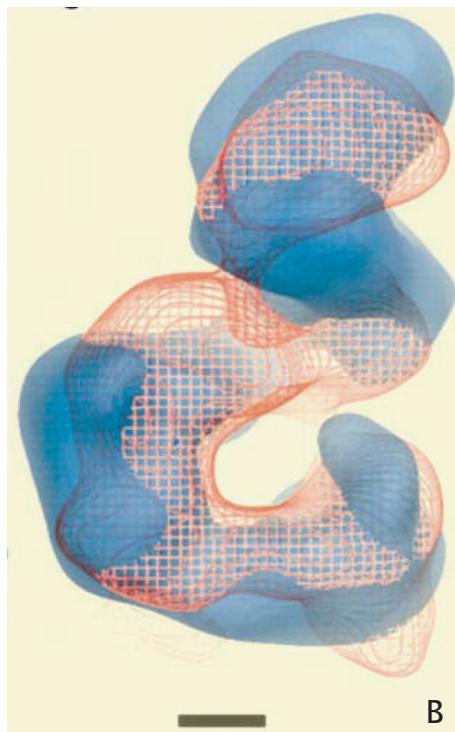


Figure 9B : **Superposition des modèles tridimensionnels de SAGA et TFTC.**

La structure bleue pleine est SAGA, la structure rouge ajourée est TFTC. La barre d'échelle représente 3,7 nm (adapté de (Wu, 2004)).

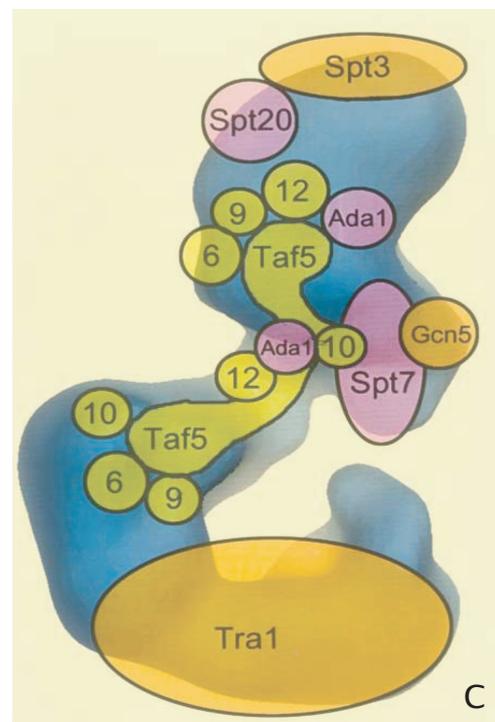


Figure 9C : **Localisation des sous-unités de SAGA dans la structure tridimensionnelle.**

Les positions données aux sous-unités résultent d'immunolocalisation sur le complexe SAGA endogène, ou de prédiction à partir des résultats connus pour TFTC (Taf5, Taf9 et Taf12). Les Taf5 sont représentés en jaune, et nommés par leurs numéro. Les facteurs structuraux sont colorés en mauve, et ceux impliqués dans la régulation de la transcription en orange. (adapté de (Wu, 2004)).

abordés avec précaution, car SAP130 est abondante et a une affinité hors du commun pour les résines de sépharose classiquement utilisées en immuno-précipitation. La spécificité de cette interaction peut donc être remise en question. SAP130 est en effet aussi facilement identifiée dans des IP dirigées contre des facteurs sans relation (par exemple TAF15 et SWI/SNF).

Néanmoins, certains résultats de tests fonctionnels laissent penser que SAP130 participe effectivement aux complexes humains SAGA-like, et les implique notamment dans la réparation de l'ADN. SAP130 appartient à une famille de protéines comprenant DDB1, un facteur de liaison à l'ADN en réponse aux UV, et le facteur de polyadénylation CPSF160 (*Neuwald et Poleksic, 2000*). Ceci laisse supposer un rôle de SAP130 dans TFTC en relation avec la réponse aux UV. En effet, les travaux de M. Brand au laboratoire ont montré que TFTC *in vitro* a une affinité plus importante pour les nucléosomes formés sur de l'ADN ayant subi une irradiation UV, et les acétyle préférentiellement (*Brand et al., 2001*). D'autre part, bien que SAP130 s'intègre au complexe d'épissage, TFTC purifié, contenant SAP130, n'a pas d'effet sur l'épissage *in vitro*.

6. Tra1/TRRAP :

La plus grande sous-unité de SAGA/TFTC est une protéine de plus de 400 kD. Ses caractéristiques structurales et fonctionnelles connues sont décrites au chapitre IV de cette introduction. Par ailleurs, Il est important de noter ici que Tra1 disparaît de SAGA comme beaucoup d'autres sous-unités si ADA1 ou SPT20 sont inhibées (*Wu et Winston, 2002*).

ii. Une structure commune

Comme pour TFIID, les informations structurales sur SAGA et les complexes homologues de mammifères proviennent en grande majorité d'étude par microscopie électronique.

La méthode a été appliquée à TFTC, TFIID et SAGA seuls, ou après incubation avec un anticorps spécifiquement dirigé contre l'une des sous-unités. Dans ce cas, l'anticorps attaché sur le complexe forme une protubérance détectable par superposition avec la structure de référence (cartographie par différence de densité). L'alignement de nombreuses images complexe+anticorps permet de donner une position approximative de la protéine ciblée dans le complexe.

Ainsi SAGA (**Figure 9A**) a une forme allongée d'environ 30 nm de long, qui peut être divisée en 5 lobes, dont un mobile (*Wu et al., 2004*). Cette structure est largement superposable à celle de TFTC déterminée selon la même méthode (*Brand et al., 1999a*) (**Figure 9B**). La partie centrale du complexe forme une base architecturale ayant une forte ressemblance avec le sillon accessible au solvant de TFIID. Elle contiendrait les TAFs, SPT7, SPT20 et ADA1. SAGA s'organise probablement autour de paires associées par des « Histone Fold Domains » (voir le point suivant) (**Figure 9C**). Dans le lobe III se trouve Gcn5, formant un pôle enzymatique avec ADA2 et ADA3 (positions supposées par similarité). Tra1 occupe tout un lobe (I) du complexe offrant une large zone d'interaction avec différents activateurs. Enfin, SPT3 est localisée dans le lobe V, qui a un domaine flexible et labile puisqu'il est absent de certains complexes. Il est intéressant de noter que SPT3 est ainsi largement exposé pour interagir avec TBP.

Par des expériences de KO de certains composants de SAGA et SLIK chez la levure, l'existence d'un sous-complexe stable a été démontrée. En effet, une double délétion de *spt20* et *adal* permet encore d'isoler un complexe partiel comprenant SPT7, TAF6, TAF9, TAF10 et SPT8 (*Wu et Winston, 2002*). Cette expérience montre que Tra1, malgré sa grande taille n'est pas indispensable à l'intégrité structurale d'une partie du complexe. Néanmoins, elle ne permet pas de déterminer quelles sous-unités la retiennent et sont en interaction directe avec elle. De plus, la localisation des différents partenaires sur la structure 3D de SAGA suggère que Tra1 soit placée dans le lobe I, plus proche de TAF6, TAF9 et TAF10 que de SPT20 et

ADA1 (Figure 9C). Cependant, sa disparition du complexe partiel de Wu et al. peut être liée à un changement de l'organisation spatiale du complexe en l'absence de SPT20 et ADA1 (Wu et Winston, 2002).

Aux vues du nombre de sous-unités possédant un HFD, SAGA comme TFIID pourraient sans grande surprise s'organiser dans l'espace à la façon des histones dans un nucléosome. Cette hypothèse a été proposée et étudiée pour SAGA comme pour TFIID (Selleck et al., 2001), et fait toujours l'objet d'une controverse (cf. paragraphe III.b.i.3 du chapitre 1).

Par ailleurs, la formation d'hétérodimères spécifiques entre les composants de SAGA, mais aussi de TFIID pourrait avoir un rôle autre que structural. Dans le cas de TAF10, l'hétérodimérisation influence la localisation subcellulaire de la protéine (Soutoglou et al., 2005). En effet, l'un de ses partenaires, TAF3, TAF8 ou SPT7L, doit être présent pour lui faire traverser la membrane nucléaire. De plus, l'association de TAF10 avec l'un ou l'autre détermine l'incorporation de l'hétérodimère dans TFTC ou TFIID, selon la spécificité du partenaire.

b. Données spécifiques aux complexes de levure

De par la plus grande facilité d'amplification et de mutation des lignées de levures, les recherches sur SAGA sont les plus avancées. D'importants travaux de spectrométrie de masse tandem à haut débit ont été menés sur des complexes *scSAGA* et *scTFIID* purifiés par IP. Dans cette approche, certaines sous-unités sont modifiées génétiquement pour porter une étiquette (HA ou TAP), afin d'obtenir d'importantes quantités de protéines partiellement purifiées. Les résultats donnent une vision globale des constituants majoritaires et minoritaires des deux complexes, et ont permis d'identifier des sous-unités jusqu'ici inconnues (Link et al., 1999 ; Sanders et al., 2002).

i. sous-unités connues uniquement chez SAGA/SLIK

1. Ubp8 et Sgf11:

Ubp8 fait partie de ces sous-unités de SAGA identifiées récemment dans diverses expériences de protéomique à haut débit (Gavin et al., 2002 ; Ho et al., 2002 ; Sanders et al., 2002). Elle était connue auparavant pour sa participation au processus réversible d'ubiquitinylation des protéines. L'ubiquitine est une petite protéine qui est ajoutée de façon covalente, sous forme de monomère ou de polymère au groupement latéral NH₂ des lysines (pour une revue (Schwartz et Hochstrasser, 2003)). Cette modification particulière déclenche en général la dégradation de la protéine par le protéasome. Cependant, des conséquences différentes de l'ubiquitinylation ont été décrites récemment, parmi lesquels la régulation de l'activité de certaines enzymes, ou de l'accessibilité de la chromatine.

En effet, il a été proposé que les ubiquitynylations participent aussi à l'établissement du code histone. Les histones H2A et H2B sont ubiquitylées localement autour d'un promoteur dont l'expression est activée. La présence de la « dé-ubiquitylase » Ubp8 dans SAGA confère au complexe la capacité de réguler l'état d'ubiquitinylation d'H2B. Cet événement influence les méthylations d'H3 en lysine K4 et K36, et s'intègre au processus d'activation du gène par SAGA (Daniel et al., 2004 ; Henry et al., 2003).

Le facteur Sgf11, détecté récemment par les mêmes moyens analytiques (technologie « Mudpit », (Sanders et al., 2002)) dans SAGA, collabore avec Ubp8 (Ingvarsdottir et al., 2005 ; Powell et al., 2004). Elle n'apparaît pas dans le complexe ADA, et forme avec Ubp8 un sous complexe de SAGA. En effet, sa

délétion ne remet pas en cause l'association des autres sous-unités, et ne modifie pas l'activité HAT du complexe. En revanche, une souche Δ Sgf1 l n'a plus d'effet sur l'ubiquitinylation d'H2B.

2. Chd1 :

La présence de Chd1 dans SAGA/SLIK corrobore le rôle primordial de ces complexes dans la régulation de la transcription en fonction des modifications des histones. Cette protéine, seule représentante de la famille CHD chez *S. cerevisiae*, possède deux chromodomains dans sa partie amino-terminale. Ces motifs sont connus pour reconnaître les lysines méthylées, qui servent ainsi de signe de reconnaissance spécifique entre deux acteurs impliqués dans la régulation de la transcription (pour une revue (Brehm et al., 2004)). Dans le cas de SAGA/SLIK, les chromodomains de Chd1 reconnaissent la forme méthylée de la Lysine K4 d'H3, et le complexe acétyle préférentiellement celui-ci. Chd1 participent ainsi au dialogue entre deux modifications des histones qui coopèrent dans l'activation de la transcription du gène.

3. Sgf29p et Sgf73p :

Parmis ces « nouvelles » sous-unités, Sgf29p et Sgf73p n'ont pas encore de fonction connue. Cependant, l'homologue humain de Sgf73 est la protéine Ataxine 7 (Figure 8). Une mutation dite expansion polyglutamique sur le gène codant pour l'Ataxine 7, donne lieu à une *Ataxie spinocérébelleuse*. Un autre groupe d'ataxie est lié à de telles expansions sur le gène de TBP. De façon très intéressante, l'ataxine 7 a été récemment identifié dans TFTC (Helmlinger et al., 2004), montrant ainsi qu'il s'agit d'une sous-unité conservée du complexe. La forme mutée de la protéine est aussi capable de prendre place dans le complexe, et ne semble pas perturber son activité HAT (Helmlinger D. Hardy S., Tora L., Devis D. résultats non publiés).

4. Sus1 :

Sus1 est un facteur de petite taille, présent à la fois dans SAGA, et dans un complexe d'export des mRNA vers le cytoplasme par les pores nucléaires (Rodriguez-Navarro et al., 2004). Bien qu'un autre facteur d'export (Thp1) soit aussi associé à SAGA, le complexe ne participe pas à l'export des ARN. Par ailleurs, la raison fonctionnelle de la présence de Sus1 dans SAGA n'a pas été déterminée.

Il est intéressant de noter que Sus1 partage une légère homologie avec le facteur de transcription e(y)2 de drosophile, qui est connu pour interagir avec *dm*TAF9 indépendamment de TFIID (Georgieva et al., 2001). La petite taille d'e(y)2 et de son homologue humain aura probablement empêchée jusqu'ici son identification dans des complexes HAT d'eukaryotes supérieurs.

ii. Particularité de SLIK

Le complexe SLIK/SALSA contient une forme variante de SPT7, migrant plus bas sur un gel d'acrylamide, et qui résulte très probablement d'une digestion protéolytique entre les acides aminés 1125 et 1150 de la séquence complète de SPT7 (Wu et Winston, 2002). Cette protéolyse explique l'absence de SPT8 dans SLIK, car le domaine d'interaction des deux protéines se trouve dans la partie carboxy-terminale, enlevée à la forme courte de SPT7. Ce complexe dépourvu de SPT8 semble avoir un effet radicalement différent de SAGA sur la régulation de certains gènes (Stern et al., 2002). En effet, sur des promoteurs tels que celui de TRP3, SAGA rend l'initiation de la transcription très difficile en bloquant TBP par SPT8. Sur le même promoteur, SLIK a un effet activateur. Il agit donc potentiellement comme un régulateur contradictoire de SAGA sur un groupe de gènes à déterminer. Son activation ou sa supériorité en nombre sur SAGA pourrait dépendre à un instant donné de la présence d'une protéase, qui favoriserait la production locale d'une forme courte de SPT7.

D'autre part, SALSA/SLIK comprend la protéine Rtg2. Celle-ci est indispensable au maintien de la structure de SLIK, et par conséquent à son activité HAT. Cependant son rôle dans le complexe est encore mal compris (*Pray-Grant et al., 2002*). Indépendamment, elle est liée à un mécanisme de communication entre la mitochondrie et le noyau, en réponse au stress (réponse rétrograde de la levure). Notons que les gènes apparentés à RTG2, RTG1 et RTG3, génèrent des facteurs de transcription. La présence de Rtg2 dans SLIK est donc logique, même si elle n'est expliquée par aucune incidence fonctionnelle à ce jour.

iii. Conclusion

Les études de mutagenèse successives, et de transcription d'un gène rapporteur ont permis de séparer les composants de SAGA et SILK en 3 groupes : SPT7, SPT20 et ADA1, dont la mutation donne les phénotypes les plus sévères, forment avec les TAFs la charpente du complexe, et participent à toutes les fonctions du complexe. SPT3 et SPT8 interagissent avec la machinerie de transcription, et contacte probablement le cœur du promoteur via TBP. Gcn5, ADA2 et ADA3 enfin forment un pôle catalytique.

S'y ajoute maintenant un module d'ubiquitylation formée de Sgf11 et Ubp8. Il ne serait pas étonnant que la sous-unité Chd1 participe à ce dernier module. Elle assure en effet le recrutement du complexe, SAGA ou SLIK, sur un histone méthylé en lysine K4, et cette modification est régulée par l'activité ubiquitinase/déubiquitinase d'Ubp8.

Enfin, SAGA et SLIK sont très semblables mais pourraient *in vivo* réguler la transcription de façon indépendante, soit qu'ils ne ciblent pas le même groupe de promoteur, soit qu'ils ne répondent pas aux mêmes signaux d'activation.

c. Conservation fonctionnelle de TFTC/PCAF/STAGA

En 1998, trois complexes GNAT d'origine humaine et de composition très proches ont été décrits par des laboratoires différents (*Martinez et al., 1998 ; Ogryzko et al., 1998 ; Wieczorek et al., 1998*). Ils partagent avec SAGA et SLIK un groupe de sous-unités appartenant aux familles décrites dans le paragraphe précédent : TAF9, TAF10, TAF12, TRRAP, Gcn5/Pcaf, ADA1, ADA2, ADA3, SPT3 et SPT7. S'y ajoutent TAF5L et TAF6L qui semblent spécifiques des eucaryotes supérieurs (**Figure 8**).

Par ailleurs, l'ensemble des données disponibles fait état de comportements similaires dans différents processus :

Acétylation des nucléosomes pour activer la transcription :

L'organisation de facteurs variés autour des HAT Pcaf et Gcn5, que ce soit dans TFTC, STAGA ou PCAF, leur permet d'acétyler spécifiquement certaines lysines des histones. Ceci a été démontré pour TFTC purifié qui acétyle *in vitro* l'histone H3 au sein d'un mononucléosome, ce dont Gcn5 isolé est incapable (*Brand et al., 1999b*). De même, le complexe PCAF induit une acétylation plus importante et spécifique d'H3 que la protéine Pcaf recombinante isolée (*Ogryzko et al., 1998*). Enfin STAGA acétyle la même histone et active la transcription sur un promoteur chromatinisé de façon dépendante de la présence d'acétyl-CoA (*Martinez et al., 2001*).

Interaction avec les mêmes activateurs :

La protéine Pcaf fut isolée comme co-facteur de p300 dans l'activation de la transcription (*Yang et al., 1996*). De façon concordante, notre laboratoire a montré que p300 et TFTC colaborent pour activer la transcription d'un gène rapporteur (*Hardy et al., 2002*).

D'autre part, STAGA interagit via TRRAP avec l'oncogène c-myc (*Liu et al., 2003*), qui est une cible d'acétylation de Pcaf (*Patel et al., 2004*).

Enfin, la protéine d'adénovirus E1A, qui dérégule la transcription de facteurs du cycle cellulaire durant un processus d'infection, a pour cible autant Pcaf (*Shuen et al., 2003 ; Yang et al., 1996*) qu'un complexe TRRAP/Gcn5 (*Lang et Hearing, 2003*). Dans les deux cas, E1A empêche ainsi l'interaction des complexes avec d'autres activateurs de la transcription.

Role dans la réparation des cassures induites par UV :

Indépendamment, les complexes STAGA et TFTC ont été testés pour leur capacité d'acétylation sur un fragment de chromatine en cas de lésion de l'ADN : tout deux acétylent préférentiellement les histones qui structure un ADN irradié aux UV, et de façon dépendante de la dose (*Brand et al., 2001 ; Martinez et al., 2001*).

d. Sont ils les mêmes ?

Les méthodes de purification de ces complexes ne furent pas les mêmes, et peuvent justifier quelques différences de compositions.

La protéine SAP130 tout d'abord n'apparaît que dans STAGA et TFTC, ce qui peut être expliqué par une rétention aspécifique sur le support d'IP. Le fractionnement d'extrait nucléaire qui précède l'étape d'IP anti TAF9 dans la purification de PCAF expliquerait que SAP130 soit absent, et confirmerait l'hypothèse de l'aspécificité (*Ogryzko et al., 1998*).

D'autre part, ADA1 n'est pas retrouvé dans la composition de STAGA. Celui-ci fut isolé par immuno-purification des partenaires de SPT3, à la différence de TFTC et STAGA qui furent isolés respectivement par des IP anti-TAF10 et anti-TAF9 (*Martinez et al., 1998*). ADA1 peut avoir été exclu ou déstabilisé par l'anticorps qui lie SPT3 dans la purification de STAGA. Une autre possibilité est qu'il n'ait pas été détecté par spectrométrie de masse pour des raisons techniques propres à cette étude.

Cependant, ces raisons n'expliquent pas l'absence des TAFs de grande taille qui sont détectés dans TFTC purifié sans surexpression. TFTC fut obtenu à l'origine par une triple immunoprécipitation (IP) (*Wieczorek et al., 1998*). La première IP permettait d'isoler tous les partenaires de TAF10, TFIID inclus. Les deux IP suivantes visaient à retirer TFIID par déplétion de TBP. Malgré les contrôles drastiques faits après la deuxième étape de purification, la présence de TFIID résiduel ne peut être exclu. Certains y voient l'explication de la présence de TAF2, TAF4, TAF5 dans TFTC, et leur absence de PCAF et STAGA. Cependant, cette contamination forcément minoritaire n'aurait pas permis la détection de ces TAFs par dégradation d'Edmann. Une hypothèse plus plausible est l'existence d'un « complexe » indépendant de TFTC/PCAF/STAGA, et TFIID, dans lequel se trouverait TAF10, TAF2, TAF4 et TAF5. Sur ce modèle, le complexe dit TFTC serait structuralement très proche de STAGA et PCAF.

Les véritables différences pourraient être déduite d'études fonctionnelles :

In vitro, TFTC est capable d'initier la transcription sur un ADN nu, en l'absence de TBP (*Wieczorek et al., 1998*). Ceci n'a pas été montré pour PCAF et STAGA, mais l'activité de TFTC pourrait être le fait de l'éventuel petit complexe de TAF sans TBP décrit ci-dessus. Néanmoins, l'observation de *Wieczork et al.* est conforté par l'étude de la transcription contrôlé par l'interferon I (*Paulson et al., 2002*). Celle-ci est en effet activée en l'absence de TBP et en présence de Gcn5 et TAF4, l'un des TAFs détectés uniquement dans TFTC.

De plus, la différence amenée par les enzymes HAT Pcaf et Gcn5 ne peut être négligée. Quoique très homologues, elles ont des rôles différents *in vivo*, comme le montre les phénotypes radicalement opposés de KO respectifs chez la souris. Il est possible que Pcaf et Gcn5 ne régulent pas exactement les mêmes groupes de gènes, et que par conséquent le complexe PCAF n'ait pas un rôle exactement superposable à celui de STAGA et TFIIIC dans la régulation de l'expression du génome.

Ainsi, deux caractéristiques fondamentales suggèrent que TFIIIC, STAGA et PCAF ne soient pas les mêmes. Cependant, tous trois ont en commun un certain nombre de sous-unités et un mode opératoire, ce qui suggère l'existence *in vivo* d'une base

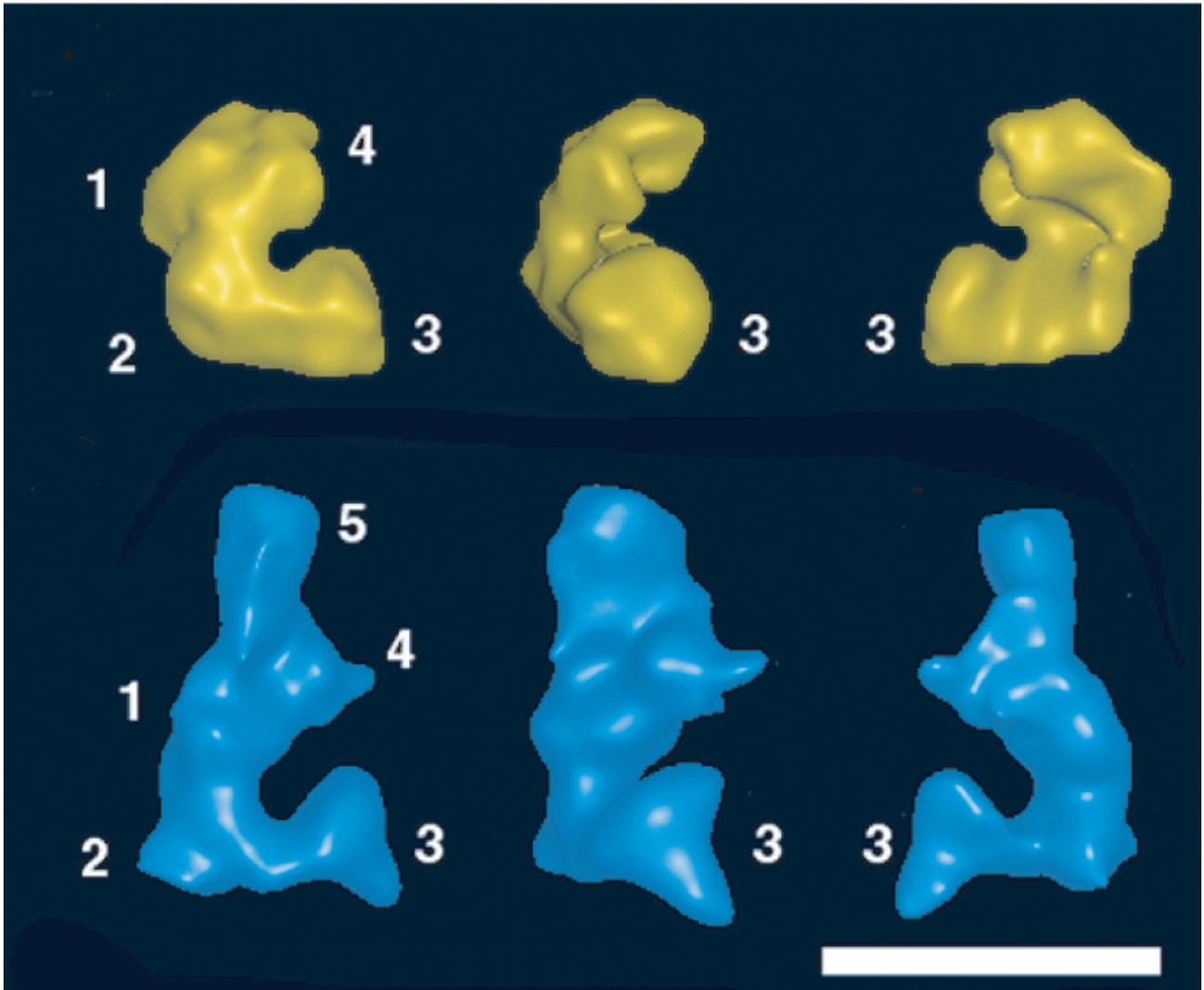


Figure 10 : **Modèles tridimensionnels des complexes TFIIID (en jaune) et TFTC (en bleu).** TFIIID est présenté en jaune en haut de l'image, TFTC en bleu en bas de l'image. Les deux modèles sont orientés de façon à ce que leurs sillons internes respectifs soient superposables. Les 3 orientations, de gauche à droite correspondent à des rotations de 80° autour d'un axe vertical. Les différents lobes sont numérotés de 1 à 4 pour TFIIID, et de 1 à 5 pour TFTC. La barre d'échelle représente 20 nm. (Adapté de (Brand, 1999b)).

structurale, qui est complétée par quelques facteurs spécifiques pour se diriger vers pour fonction précise, comme l'activation de la transcription par l'interféron par TFIIIC.

e. SAGA/TFIIIC versus TFIIID : quelle fonction particulière dans la régulation de la transcription ?

L'initiation de la transcription en réponse à un activateur était considérée comme le domaine réservé de TFIIID jusqu'à la caractérisation de SAGA et ses homologues humains. L'absence constitutive de TBP ne les empêche pas de participer à l'initiation de la transcription sur certains promoteurs.

Notons avant tout que les études biochimiques de système de transcription hors du contexte du génome, notamment chez les mammifères, ne permettent pas de différencier SAGA/TFIIIC et TFIIID. En effet, l'un comme l'autre participe à la régulation de l'expression des gènes par les hormones via les récepteurs nucléaires. Ils ont aussi une activité HAT, TAF1 pour TFIIID et Gcn5/Pcaf pour SAGA/TFIIIC, dont les cibles respectives ne semblent pas distinctes. L'un inclut TBP, l'autre interagit avec sur un promoteur, du moins chez la levure. TFIIIC et TFIIID, les complexes humains sont très semblables par leur structures tri-dimensionnelles, avec un sillon central superposable, qui pourrait être le site de liaison sur l'ADN (Figure 10).

D'autre part, l'implication de complexes de type SAGA dans la régulation de la transcription n'est pas uniquement due à leur activité HAT. En effet, la mutation du domaine HAT de Gcn5 n'empêche pas SAGA d'avoir une influence nette sur le génome (Huisinga et Pugh, 2004).

Des mutations comparées ou combinées de sous-unités spécifiques de SAGA et yTFIIID montrent que ces deux complexes sont essentiels, complémentaires et suffisants à la régulation de la transcription de l'ensemble des gènes (Huisinga et Pugh, 2004). Cependant, ils régulent des groupes de gènes distincts. Une fraction de 10% environ des gènes testés est dépendante de SAGA tandis que TFIIID influence la transcription de la large majorité restante. Le groupe dépendant de SAGA comprend une grande proportion de gènes activés par une situation de stress (oxydation, chaleur, carence...), et dont l'expression est soumise à une régulation très fine. Par ailleurs cette distinction entre gènes dépendant de TFIIID et gènes dépendant de SAGA est renforcée par des tendances différentes dans le niveau d'acétylation de H4. Les promoteurs de gènes dominés par TFIIID sont en effet proportionnellement plus acétylés sur H4. Ceci suggère que la répartition observée soit liée à l'acétylation des histones.

De façon très surprenante, les promoteurs de gènes activés en cas de stress sont aussi ceux qui contiennent majoritairement une boîte TATA, au contraire des gènes ne répondant pas au stress (Basehoar et al., 2004). Les premiers sont plus particulièrement régulés par SAGA, et leur régulation fine inclut aussi les régulateurs de la chromatine et de TBP. Les seconds semblent soumis à un processus plus simple dominé par TBP, ce qui est en accord avec l'étude de Huisinga et al..

La conclusion de ces études est que, chez un organisme simple comme la levure, SAGA et TFIIID assurent chacun une part complémentaire de la régulation du génome, et que leur recrutement sur des promoteurs particuliers ne dépend pas des mêmes signaux. Une telle division du génome doit être conservée chez les eucaryotes plus

sc NUA4	hs TIP60	dm Tip60	sc SWRC	hs SRCAP	hs p400	sp INO80	hsTBAF	Domaines caractéristiques	Remarques fonctionnelles
ESa1	Tip60p ou Tip60b	dTIP60		/			hat ??	HAT	seule HAT essentielle chez la levure
Tra1	TRRAP	dtra1		/	Trrap		Trrap	PI-3 kinase/ATM	cible des coactivateurs
Eaf1/Swr1	hDomino (p400)	Domino	Eaf1/Swr1	SRCAP	p400	INO80		SANT, HSA	ATPase de la famille SWI2/SNF2
Yng2	ING3	dIng3		/				PHD	suppresseur de tumeur, co-racteur de E2F
Act1	Actine B	Act87E			actine	Act1			protéine structurale
Arp4	BAF53a	BAP55	Arp4	BAF53a	BAF53a	Arp4	BAF53		similarité avec l'actine
Eaf3	MRG15	dMrg15		/				Chromodomains	vieillesse cellulaire, repression de la transcription
Epl1	Epc1	E(Pc)		/	Epc1			Domaine EpcA	suppresseur des effets de position bigarés, contrôle épigénétique
Eaf2/Swc4	DMAP1	dDMA	Eaf2/swc4	DMAP1				SANT	co-facteur de la méthylase A de l'ADN
Bdf1 ?	Brd8/ TRCP120	dBRD8	Bdf1	/				1 ou 2 bromodomains	liaison des histones, interaction avec les NR
Yaf9	Gas41	dGas41	Yaf9	GAS41				YEATS	lié au facteur leucemogène AF9/ENL
Swc2 ?	YL-1	dYL-1	Swc2	YL-1					suppresseur de tumeur potentiel
Eaf6	hEaf6	dEaf6		/					
Eaf5	?	?							
Eaf7	?	?							
(Rvb2) /	Tip48(reptin)	dReptin	Rvb2	Tip48	TIP48**	Rvb2	Tip48	Walker A et B	helicase et ATPase
(Rvb1) /	Tip49(pontin)	dPontin	Rvb1	Tip49	TIP49**	Rvb1	Tip49	Walker A et B	helicase et ATPase
Hmo1 ?								HMG	lié à la transcription par l'ARN pol I des ARN ribosomiaux
	MRGBP ?								lié à MRG15
	MRGX ?								lié à MRG15
						Arp5		Bromodomaine	similarité avec l'actine
						Arp8			similarité avec l'actine
						Arp7			similarité avec l'actine
						Arp9			similarité avec l'actine
			Arp6	Arp6					similarité avec l'actine
			Swc6/Vsp71	ZNF-HIT1				Doigt de zinc	
			Htz1						histone variant spécifique des frontières hétérochromatine/euchromatine
		H2Av		H2AZ		H2AX *		motif SRQ Cterm	histone variant marqueur de DSB
						TAF30			"TBP associated factor", co-activateur
						nhp10			HMG-1 like
						les1			
						les3			

Figure 11 : **Composition et caractéristiques des complexes NuA4/TIP60 et des complexes ATPases similaires.**

La partie gauche du tableau regroupent les complexes TIP60 chez différentes espèces, tandis que la partie droite présentent les complexes ATPase partageant certaines sous-unités avec NuA4 ou TIP60. Les facteurs homologues se trouvent sur une même ligne. Surligné en rose apparaît le sous-complexe piccoloNuA4. Les facteurs colorés en jaunes sont ceux dont la conservation chez les trois espèces est avérée. Le bleu clair souligne les sous-unités communes aux complexes ATPase présentés. / : la présence de ce facteur est exclue. ? : la présence de ce facteur n'a pas été vérifiée. * : H2AX n'est présent que sous sa forme phosphorylée et en cas de cassure double brin de l'ADN. ** : Tip48 et Tip49 sont exclues si E1A est présent.

évoluées, mais doit être compliquée par l'incidence d'autres phénomènes régulateurs, en réponse à des stimuli différents du stress cellulaire.

Cette dicotomie dans la régulation du génome apporte un éclairage particuliers aux récents travaux de Soutoglou et *al.*. TAF10 qui est commun à TFIID et SAGA/TFTC est relocalisé dans le noyau de la cellule uniquement par hétérodimérisation avec l'un de ses partenaires, TAF3, TAF8 et SPT7. Si les deux premiers sont présents à la fois dans TFIID et TFTC, ce n'est pas le cas de SPT7L. L'incorporation de TAF10 dans SAGA/TFTC ou TFIID pourrait dépendre de la protéine avec laquelle il est entré dans le noyau. Si les concentrations cytoplasmiques de TAF3 et TAF8 par rapport à SPT7L sont régulées par des signaux de extranucléaires, il peut s'agir d'un moyen direct d'influencer la ratio TFIID versus SAGA/TFTC dans le noyau, et donc le programme de transcription de la cellule. Il serait intéressant de savoir si un environnement hostile, facteur de stress, influence le transfert nucléaire d'hétérodimères TAF10/SPT7L par rapport aux hétérodimères TAF10/TAF3 ou TAF8.

III. Le complexe NuA4/TIP60

De même que Gcn5, Tip60p seule est incapable d'acetyler les queues d'histones organisées en nucléosome. L'activité HAT du complexe TIP60 sur la chromatine dépend de la présence des sous-unités entourant l'enzyme. Celles-ci semblent même réguler la spécificité de l'acétylation envers H4 et H2A, par rapport à H3, qui peut être acétylé par le complexe si les 4 histones ne sont pas organisées en octamère (Ikura et al., 2000).

S. cerevisiae a un complexe homologue, nommé NuA4 (Allard et al., 1999), ainsi que *D. melanogaster* (*dmTIP60*) (Kusch et al., 2004). Cependant, certaines sous-unités conservées chez ces différentes espèces sont aussi présentes dans des complexes indépendants, et le plus souvent dotés d'activité Hélicase/ATPases propre au remodelage de la chromatine. Une synthèse de ceux-ci est présentée dans la [Figure 11](#).

a. Composition

Cette composition est résumée dans la Figure 11.

ESA1/Tip60p :

L'enzyme HAT du complexe de levure NuA4 est Esa1, qui est issue d'un gène essentiel à la survie et au bon déroulement du cycle cellulaire (Clarke et al., 1999). Son homologue humain Tip60p est la sous-unité catalytique du complexe du même nom, TIP60. Le variant d'épissage Tip60b/PLIP chez *H. sapiens*, s'intègre à un complexe extrêmement similaire et dotée aussi d'activité HAT.

Yng2/ING3 :

Il a été montré dans un premier temps que *scYng2*, l'homologue de l'agent suppresseur de tumeur humain p33 (ING1), interagissait avec Tra1 et Esa1 (Loewith et al., 2000). Il s'intègre en réalité à NuA4, participe à son maintien structural et à son activité HAT (Nourani et al., 2001). Cependant, cette activité n'est pas complètement inhibée en l'absence de Yng2, sa réduction semble surtout influencer le passage en

mitose et en méiose des cellules (Choy *et al.*, 2001). Ce défaut de transition mitotique est liée chez les mutants *yng2* à une sensibilité exacerbée aux lésions de l'ADN durant la phase S (Choy et Kron, 2002).

La protéine ING3, de la même famille de suppresseur de tumeur qu'ING1 a été identifié dans le complexe humain TIP60 (Doyon *et al.*, 2004), mais rien ne permet d'affirmer que sa fonction soit similaire à celle d'Yng2.

Epl1/Epc1 :

Ces facteurs sont les homologues de la protéine « Enhancer of polycomb » de *D. melanogaster*, qui est liée à la régulation épigénétique des gènes homéotiques et à la formation de l'hétérochromatine (Campbell *et al.*, 1995). Epl1 est connu pour réguler la transcription (Shimono *et al.*, 2000). Dans le complexe Tip60, deux formes d'Epc1 issues d'un épissage alternatif ont été identifiées. Elles permettent probablement la formation de complexes légèrement différents (Doyon *et al.*, 2004). Le domaine amino-terminal de *scEpl1*, qui est conservé chez ses orthologues, maintient ensemble Esa1 et Yng2, et semble fondamental dans la capacité du complexe à acétyler la chromatine (Boudreault *et al.*, 2003). La partie carboxy-terminale est nécessaire, par ailleurs, à l'assemblage des autres sous-unités.

Tra1/TRRAP :

La plus grande sous-unité et la cible dans le complexe des activateurs sera décrite en détail au chapitre IV.

Rvb2/TIP48 et Rvb1/TIP49 :

Ces deux protéines de poids moléculaire très proches ressemblent à la protéine bactérienne RuvB, qui est une Hélicase hexamérique en forme d'anneau. Elle est dotée d'activité ATPase et Hélicase dépendante de l'ATP, et impliquée dans la réparation des lésions de l'ADN (Kanemaki *et al.*, 1999). Tip48 et Tip49 possèdent aussi les domaines de liaison et l'hydrolyse de l'ATP, et sont responsables de l'activité hélicase du complexe. Notons que les homologues de TIP48 et TIP49, Rvb2 et Rvb1 respectivement, sont absentes de NuA4. En revanche, *dmReptin* et *dmPontin*, qui sont les homologues de *D. melanogaster*, participent au complexe TIP60 de cet organisme. Leur association à l'HAT Tip60 est donc relativement récente dans l'évolution.

Eaf1/p400/Domino :

Eaf1 (ou Vid21) possède un motif SANT (domaine commun à SWI3, ADA2, NcoR, et TFIIB) que l'on trouve fréquemment chez les facteurs de complexe de remodelage de la chromatine. Il pourrait se lier spécifiquement aux queues d'histones (cf. chapitre 2-IV). En dehors de ce motif, Eaf1 partage peu de séquence homologue avec p400, et est notamment dépourvue de domaine ATPase. p400 possède en effet un domaine d'homologie avec la famille d'ATPase SWI/SNF2, qui dans le complexe TIP60 participe à l'interaction avec les sous-unités hélicases Tip48 et Tip49, comme dans le complexe p400 (Fuchs *et al.*, 2001). L'absence de ce domaine chez *scEaf1* justifie que Rvb1 et Rvb2 ne soient pas rattachées au complexe NuA4. Dans le complexe de levure SWRC, Eaf1 (aussi appelé Swr1) catalyse l'échange d'H2A contre son variant Htz1 (Krogan *et al.*, 2003 ; Mizuguchi *et al.*, 2004).

Arp4/BAF53 et l'Actine :

Arp4 est à la fois un facteur ressemblant à l'actine (Poch et Winsor, 1997), un membre de la large famille des SPT, et un facteur lié à la régulation épigénétique de la transcription (Jiang et Stillman, 1996). Son homologue BAF53 « BRG1 associated factor 53 » participe aussi au complexe de remodelage de la chromatine BAF (Zhao *et al.*, 1998). De même, l'actine β est présente dans de nombreux complexes de remodelage dépendant de l'ATP. Arp4/BAF53 et Act1/actine β semblent participer à l'architecture de TIP60 plus qu'à ses activités enzymatiques (Ikura *et al.*, 2000). En effet, une mutation sensible à la

température d'Arp4 induit une désorganisation du complexe, et l'absence d'activité HAT *in vitro* (Galarneau *et al.*, 2000).

Eaf2/DMAP1 :

DMAP1 est une protéine essentielle qui interagit avec la « DNA méthylase 1 » (DMAP1 : DNA methyltransferase 1 associated protein), et apparaît dans les foyers de réplication de l'ADN (Rountree *et al.*, 2000). Cependant, la fraction majoritaire de DMAP1 n'est pas dans TIP60 mais dans un autre complexe, avec les facteurs SRCAP et YL1, ainsi qu'un certain nombre de sous-unités de TIP60 (Figure 11). Ce complexe de fonction inconnue est doté d'une activité ATPase mais est incapable d'acétyler les histones (Doyon *et al.*, 2004). Il a été récemment caractérisé en détail, et ressemble nettement au complexe de levure SWRC (Figure 11), impliqué dans le remodelage dépendant de l'ATP des nucléosomes (Cai *et al.*, 2005). Ce dernier favorise particulièrement la transcription des gènes proches des zones d'hétérochromatine (Krogan *et al.*, 2003).

De façon concordante, l'homologue de DMAP1 chez *S. cerevisiae* Eaf2 apparaît dans la composition de NuA4, et participe au complexe SWRC (Eaf2 = Swc2).

Eaf3/MRG15, (MRGBP et MRGX) :

Eaf3 est liée à au facteur MSL3 de drosophile impliqué dans la compensation de dosage du chromosome X. Il participe à NuA4, mais n'est pas indispensable à l'acétylation des histones *in vitro*. L'homologue d'Eaf3 chez l'homme est MRG15, et tous deux possède un chromodomaine.

Par ailleurs, MRGBP, MRGX et MRG15 ont des similarités avec le facteur humain MORF4 (Mortality factor 4), et ont été détectés dans deux contextes différents. MRG15 apparaît dans une purification du complexe *hs*TIP60 par IP contre une forme marquée de Tip60p (Doyon *et al.*, 2004), tandis que MRG15 et MRGX co-purifient avec certains facteurs de TIP60 dans une IP anti-MRGBP (Cai *et al.*, 2003). Il est raisonnable d'affirmer que MRG15 est partie intégrante du complexe, mais rien n'est sûr pour MRGX et MRGBP, contrairement aux conclusions de Cai *et al.*. La co-purification de ces derniers avec les autres composants de TIP60 peut être de nature indirecte *via* MRG15 ou YL-1 selon les derniers résultats (Cai *et al.*, 2005). En effet, MRG15 est le seul facteur de ce groupe retrouvé dans une purification plus fine et plus spécifique du complexe TIP60 à partir d'une sous-unité largement décrite (Doyon *et al.*, 2004). Notons que MRG15 participe aussi au complexe Sin3/HDAC doté d'une activité de déacétylation de la chromatine et de répression de la transcription (Yochum *et Ayer*, 2002).

Bdf1/Brd8 :

Brd8 existe sous deux formes très similaires chez *H. sapiens*. Sa forme courte est un co-activateur des récepteurs TR et RXR appelé TRcp120 (Monden *et al.*, 1999), et comprend un chromodomaine, tandis que la forme longue en comprend deux. Son homologue chez *D. melanogaster* *dm*Brd8 fait partie du complexe isolé récemment (Kusch *et al.*, 2004), tandis que la présence de *sc*Bdf1 avec les autres facteurs de NuA4 n'est pas aussi clairement décrite. Doyon *et al.* affirment que Bdf1 est absent comme Rvb1 et Rvb2 de NuA4, montrant que ces facteurs se seraient intégrés récemment, tandis qu'une autre étude décèle Bdf1 dans une fraction des complexes (Krogan *et al.*, 2004a). Par ailleurs, Bdf1 pourrait être une sous-unité labile de TFIID de levure, dont les bromodomains remplaceraient ceux que *sc*TAF1 ne possède pas (Matangkasombut *et al.*, 2000). Elle participe aussi au complexe ATPase SWRC de levure. Par sa capacité à reconnaître les histones acétylés, Bdf1 dirige SWRC vers les zones frontières entre euchromatine et hétérochromatine, et limite ainsi l'extension de la seconde (Ladurner *et al.*, 2003). Un rôle similaire au sein de NuA4 peut être supposé.

Yaf9/Gas41 :

Gas41 est issu d'un gène essentiel au niveau cellulaire et pourrait être un facteur de transcription (Zimmermann *et al.*, 2002). Sa séquence est très proche de celle du facteur leucémogène AF9/ENL, et est l'homologue chez l'homme de *scYaf9* (Fischer *et al.*, 1997). Cette dernière possède un domaine YEATS, fréquent chez les facteurs de régulation de la transcription ou de modification de la chromatine. Au sein de NuA4, elle interagit directement avec Eaf2 (Swc4), l'homologue de DMAP1 (Bittner *et al.*, 2004). L'interaction équivalente entre DMAP1 et GAS41 est donc probable dans le complexe NuA4. De façon étonnante, *ScYaf9* est nécessaire au maintien de la polymérisation des microtubules en cas de déroulement anormal de la mitose (point de contrôle intra-mitotique) (Le Masson *et al.*, 2003).

Swc2/YL-1 :

YL-1 est le dernier facteur identifié de TIP60, et celui qui le lie directement au complexe SRCAP, homologue de SWRC de levure (Cai *et al.*, 2005). Le gène *YL-1* fut remarqué tout d'abord pour sa capacité à inhiber la croissance exponentielle de cellules immortalisées par un virus (Horikawa *et al.*, 1995). Son homologue Swc2 appartient à SWRC, comme Eaf1, Arp4, Eaf2, Yaf9, Swc6, Rvb1, Rvb2, Arp6 et l'histone variant *htz1* (Cai *et al.*, 2005).

La présence d'une dernière sous-unité a été suggérée récemment : La protéine Hmo1, caractérisée par son domaine d'interaction avec l'ADN HMG (High mobility group) est détectée par spectrométrie de masse dans des IP contre les facteurs de NuA4 Epl1, Yng2 et Eaf5 (Krogan *et al.*, 2004a).

b. Conservation :

L'ensemble du complexe TIP60 a une masse approximative de 1,8 kD (Doyon *et al.*, 2004), et NuA4 de 1,3 kD. À la différence de SAGA et TFTC, peu de facteurs ont été identifiés dans le complexe de levure, sans que leurs homologues ne soient détectés dans le complexe mammifère (Figure 11). Ainsi, la composition décrite ci-dessus montre une conservation exceptionnelle de la structure, et très probablement, de la fonction de NuA4/Tip60.

La purification de NuA4, puis celle TIP60 ont permis d'isoler un complexe plus petit, dont l'existence *in vivo* est vérifiée, et qui est aussi capable d'acétyler les histones. Esa1, Epl1 et Yng2 chez *S. cerevisiae* forment ce « Piccolo Nua4 » qui a une activité d'acétylation sur les nucléosomes beaucoup plus marquée que sur des histones libres (Boudreault *et al.*, 2003). Son équivalent, comprenant Tip60p, Epc1 et ING3 existent aussi *in vivo* chez l'homme, et a les mêmes capacités (Doyon *et al.*, 2004).

Par ailleurs, en plus de ce noyau catalytique, un noyau structural existe : il est formé des protéines liées à l'actine, Arf4 et Actine β . Yaf9 et p400 pourraient aussi y participer car elles maintiennent respectivement Eaf2 et Tip48/Tip49, dans le cas de TIP60 seulement.

c. Une étonnante richesse de complexes semblables

La Figure 11 regroupent les différents « complexes » partageant quelques facteurs avec NuA4/TIP60, et évoqués ci-dessus.

Les différents travaux ont rapporté l'existence *in vivo* d'un complexe p400 très proche de TIP60 et d'un complexe que nous appellerons TBAF (TRRAP-Baf53-Tip48-Tip49). Le premier est dépourvu d'activité HAT, et hydrolyse l'ATP, tandis que le second a une activité d'acétylation d'origine inconnue. De même chez la levure, le complexe de remodelage de la chromatine SWRC partage de nombreux facteurs avec NuA4. Enfin, une structure « PiccoloNuA4 » (Tip60p-ING3-Epc1) identifié chez la levure et

l'homme semble être le cœur catalytique de TIP60. Une telle diversité de structures basées sur les mêmes éléments résulte probablement d'une labilité importante des acteurs du remodelage de la chromatine. Elle est confirmée par le caractère apparemment non indispensable de facteurs comme Yaf9 et Bdf1.

Ces « complexes » existent peut-être à un même moment dans une cellule, mais en quantité infime, et à l'endroit du génome où leur action est nécessaire. La transition de l'un à l'autre, de p400 à TIP60 par exemple, doit être possible *in situ*, en fonction d'un changement dans la nature du remodelage requis.

Par ailleurs, le nombre et la diversité de ces structures dessinent un possible schéma d'évolution entre les différentes entités chez la levure, chez la drosophile, puis chez l'homme. Les sous-unités Rvb1 et Rvb2 par exemple sont absentes de NuA4, mais participent à SWR1. Certaines sous-unités de l'un pourraient avoir trouvé une place plus appropriée avec les sous-unités de l'autre au cours de l'évolution, pour donner les complexes légèrement différents que sont TIP60 et SRCAP.

d. Fonctions

i. Activités enzymatiques

Le complexe NuA4 acétyle préférentiellement l'histone H4 au sein d'un nucléosome : les quatre lysines conservées K5, K8, K12 et K16 sont des substrats possibles (*Allard et al., 1999*). Par ailleurs, TIP60 peut acétyle H4 mais aussi H2A dans un nucléosome. L'acétylation de ce dernier semble être primordiale à l'implication de TIP60 dans la réparation des cassures double brin de l'ADN.

De part ses sous-unités TIP48 et TIP49, le complexe humain est doté d'une activité ATPase, qui est beaucoup plus efficace que celle de l'une ou l'autre des enzymes isolées (*Ikura et al., 2000*). Elles apportent une activité Hélicase dans le sens 3'-5', même en l'absence d'ATP.

ii. Activation de la transcription

Comme les complexes de type SAGA/TFTC, NuA4/Tip60 coopère avec d'autres activités qui permettent l'activation de la transcription en augmentant l'accessibilité de l'ADN à transcrire.

1. NuA4 et les activateurs acides de levure

Comme SAGA, le complexe NuA4 est recruté sur la chromatine par un activateur acide chimérique Gal4-VP16 (*Vignali et al., 2000*). Il acétyle l'histone H4, ce qui permet l'activation de la transcription. Cependant, son activité peut s'étendre sur une large zone autour du promoteur, contrairement à l'acétylation d'H3 par SAGA qui reste très localisée. Il est capable d'interagir *in vitro* avec Gal4, Hap4, et VP16 via Tra1, dans ce qui semble être un mécanisme conservé (*Brown et al., 2001*).

Esa1, donc NuA4, régule probablement la transcription des protéines ribosomales (RP). Elle est présente de façon spécifique sur tous les promoteurs de RP dotés de site de liaison pour les activateurs Rap1 ou Abf1 (*Reid et al., 2000*). Il s'agit probablement ici d'un rôle particulier de NuA4, visant à favoriser l'assemblage de ribosomes nécessaires à la machinerie de traduction, en réponse à un stimulus de croissance cellulaire. La présence potentielle dans le complexe du facteur lié à la transcription des ADN ribosomiaux Hmo1 n'est probablement pas sans rapport avec ce rôle de NuA4 (*Reid et al., 2000*).

2. TIP60 et les récepteurs nucléaires

NuA4 et TIP60 contiennent respectivement Tra1 et TRRAP, dont les interactions directes avec des activateurs ont été largement décrites. En particulier, TRRAP est une cible privilégiée des récepteurs nucléaires, chez les eucaryotes supérieurs. Il n'est donc pas étonnant que NuA4 soit comme SAGA la cible du récepteur aux hormones glucocorticoïdes (*Wallberg et al., 1999*).

Cependant, TRRAP n'est pas le seul point d'ancrage des NR dans le complexe TIP60. L'enzyme Tip60p elle-même interagit avec quelques NR *in vitro* et active la transcription de gènes rapporteurs qui en dépendent (*Brady et al., 1999*). Cependant, malgré ces données concordantes, aucune étude ne permet d'affirmer que le complexe TIP60 est amené par un récepteur nucléaire sur un promoteur pour activer la transcription. Rien ne distingue non plus les interactions des récepteurs nucléaires avec Tip60p ou TRRAP au sein du complexe.

3. TIP60 et les facteurs de transcription spécifiques

Par le biais de la sous-unité TRRAP, le facteur de transcription et oncogène c-Myc peut recruter le complexe TIP60 (*Frank et al., 2003*). La transformation oncogénique qui en résulte ne dépend pas directement de TRRAP, comme l'ont montré Dugan et al. (*Dugan et al., 2002*), mais requiert plutôt l'activité ATPase-Hélicase de TIP48/TIP49 (*Wood et al., 2000*). Dans ce cas, au contraire de l'activation par les récepteurs nucléaires, l'implication du complexe dans son ensemble est nécessaire. Une voie de contrôle supplémentaire existe probablement car le facteur de transcription c-Myc est lui-même un substrat d'acétylation de Tip60p (*Patel et al., 2004*).

Le complexe TIP60 est aussi la cible du facteur de transcription E2F1, particulièrement nécessaire à la progression du cycle cellulaire. Il est amené sur le promoteur de gènes spécifiques à E2F1, et impliqué dans l'entrée de la cellule en phase S (*Taubert et al., 2004*). De façon concordante, l'introduction d'un dominant négatif d'E2F a pour conséquence une diminution de l'acétylation drastique pour H4 et partielle pour H3 sur ces promoteurs, mais aussi l'arrêt du cycle cellulaire en G1. E2F1 se lie par ailleurs à TRRAP, qui doit être la sous-unité permettant le recrutement du complexe (*McMahon et al., 1998*).

Dans le domaine de la transcription activée, TIP60 participe aussi à la régulation de certains gènes soumis au facteur de réponse inflammatoire NF- κ B (*Baek et al., 2002*). Dans ce cas particulier, il est en compétition avec le complexe répresseur N-CoR.

Notons enfin que les rapports de TIP60 avec la transcription sont inhérents à sa fonction HAT dans tous les cas décrits. Ceci le différencie nettement de l'autre complexe HAT, SAGA/NuA4, qui influence la transcription par d'autres moyens que la seule acétylation des histones

iii. Contrôle épigénétique de l'expression des gènes

En plus d'un rôle d'acétylation locale et ciblée de promoteurs qui doivent être activés, le complexe NuA4 semble participer à une acétylation globale du génome, qui se transmettrait d'une génération à l'autre et participerait à la régulation épigénétique de l'expression des gènes.

Ceci concorde avec l'implication génétique de nombreux facteurs de NuA4/Tip60 dans des phénomènes épigénétiques comme la suppression d'effet de position (Epl1/Epc1 par exemple (*Boudreault et al., 2003*)), et la compensation de dosage chez la drosophile (Eaf3/MRG15 par exemple (*Eisen et al., 2001*)). D'autre part, Esa1, qui n'existe pas *in vivo* en dehors du complexe, se localise dans des sites discrets du génome, forcément hors de l'hétérochromatine (*Galarneau et al., 2000*). Elle a un effet global sur le niveau d'acétylation d'H4 dans tout le génome, sans que ceci soit lié au niveau de transcription (*Reid et al., 2000*).

Enfin, les facteurs partagés par NuA4 et SWRC, comme Eaf1/vid21 et Eaf2/Swc4 suggèrent un lien avec la maintenance de la répression par l'hétérochromatine (Krogan *et al.*, 2003). Ils sont indispensables à l'activité d'acétylation du complexe, mais, dans des tests d'interaction génétique, apparaissent plus proches des sous-unités de SWRC que d'Eaf5 et Eaf7 qui sont spécifiques de NuA4. Ceci suggère une implication importante de NuA4 dans le contrôle de la condensation en hétérochromatine de certaines régions du génome, en collaboration avec le complexe SWRC et le variant d'histone Htz1. Leur activité commune semble particulièrement dirigée vers les centromères. En particulier, les mutants $\Delta vid21$ et $\Delta Yng2$ sont particulièrement sensibles à l'agent de dépolymérisation des fuseaux mitotiques bléomycine. De façon concordante, Yaf9 qui est commune à SWRC et NuA4, participe au point de contrôle intra-mitotique d'attachement des microtubules (Le Masson *et al.*, 2003).

iv. NuA4/TIP60 et la réparation des lésions de l'ADN

Avant même la caractérisation des complexes de remodelage de la chromatine, une implication des histones acétyltransferases dans la réparation des cassures double brin de l'ADN était soupçonnée. En effet, le remplacement des lysines spécifiquement acétylées sur l'histone H4 active le point de contrôle soumis à Rad9 et caractéristique des lésions de l'ADN (Megee *et al.*, 1995). De plus, la sous-unité catalytique de NuA4, Esa1, s'est révélée essentielle à la réparation des cassures double brin par réparation sans homologie (NHEJ, chapitre 4, paragraphe III.b.ii). Son partenaire Arp4 présent également dans NuA4 se lie aux extrémités des histones à proximité des sites de cassures (Bird *et al.*, 2002). Et enfin, *scYng2* est essentiel à la régulation du point de contrôle intra-mitotique, qui est déclenché en cas de lésion de l'ADN (Choy *et Kron*, 2002). De même pour l'homme, l'inhibition de Tip60p par un mutant sans activité HAT et dominant négatif, entraîne un défaut de la réparation des cassures double brin de l'ADN (Ikura *et al.*, 2000), et un défaut du point de contrôle déclenchant l'apoptose en cas de lésion importante.

Des expériences au niveau de la chromatine ont permis de montrer le recrutement du complexe NuA4, sur les sites de cassures DSB, suite à la phosphorylation de l'histone H2AX. Arp4 est responsable de la reconnaissance de la forme phosphorylée de H2AX, et permet aussi aux complexes INO80 et SWI/SNF d'être attirés sur le site de lésion (Downs *et al.*, 2004).

L'étude du complexe TIP60 chez *D. melanogaster* a permis une compréhension plus détaillée encore du mécanisme. Sur un site de cassure double brin, *dmTip60p* a la capacité d'acétyler un histone variant H2Av (homologue de H2AX) phosphorylé, puis de le remplacer par un H2Av non phosphorylé (Kusch *et al.*, 2004). Cet échange se déroule suite à l'incorporation d'H2Av phosphorylé dans la chromatine en réponse à une irradiation. Il est par ailleurs dépendant de l'acétylation de H2Av phosphorylé en Lysine 5. De façon tout à fait concordante, les sous-unités impliquées dans cette action sont l'HAT Tip60 et l'ATPase Domino p400 (famille Swi2/Snf2).

Cependant, il est important de noter que cette acétylation de K5 H2A n'avait pas été décrite jusqu'ici, dans des cellules non irradiées. Cette modification pourrait spécifique du variant H2Av (ou H2AX), ou de sa forme phosphorylée.

e. Conclusion

Le complexe HAT NuA4/TIP60 est multifonctionnel, et agit au sein d'un réseau de complexes : il partage des sous-unités avec p400, SWRC/SRCAP et INO80 qui ont tous la capacité de remodeler la chromatine. Leurs activités respectives sont probablement soumises aux mêmes cascades de régulation, et apparaissent de façon concomittante, ou très proche dans le temps sur un même site. Ces collaborations

semblent servir à la fois l'activation de gène spécifique par remodelage localisée de la chromatine, et le maintien de marques épigénétiques sur l'ensemble du génome.

TIP60/NuA4 apparaît en effet comme un acteur central de la régulation épigénétique, autant qu'un activateur spécifique et local de la transcription par l'acétylation des histones autour d'un promoteur. Les signaux responsables de ces fonctions sont probablement distincts, et restent à identifier.

Enfin, le rôle de NuA4/TIP60 dans la réparation des cassures double brin paraît en marge, dans l'état actuel des connaissances. L'activité HAT du complexe est essentielle dans ce processus comme dans l'activation de la transcription. De façon similaire, la collaboration entre TIP60 et des complexes de remodelage dépendant de l'ATP est très probable sur le site de réparation (*Downs et al., 2004*). Cependant, TIP60 apparaît utile à la fin du processus de réparation. En effet, il enlève l'histone H2AX phosphorylé qui signale la présence de DSB, probablement après l'étape cruciale de religation. Ceci est à l'inverse de son intervention en amont de l'initiation de la transcription.

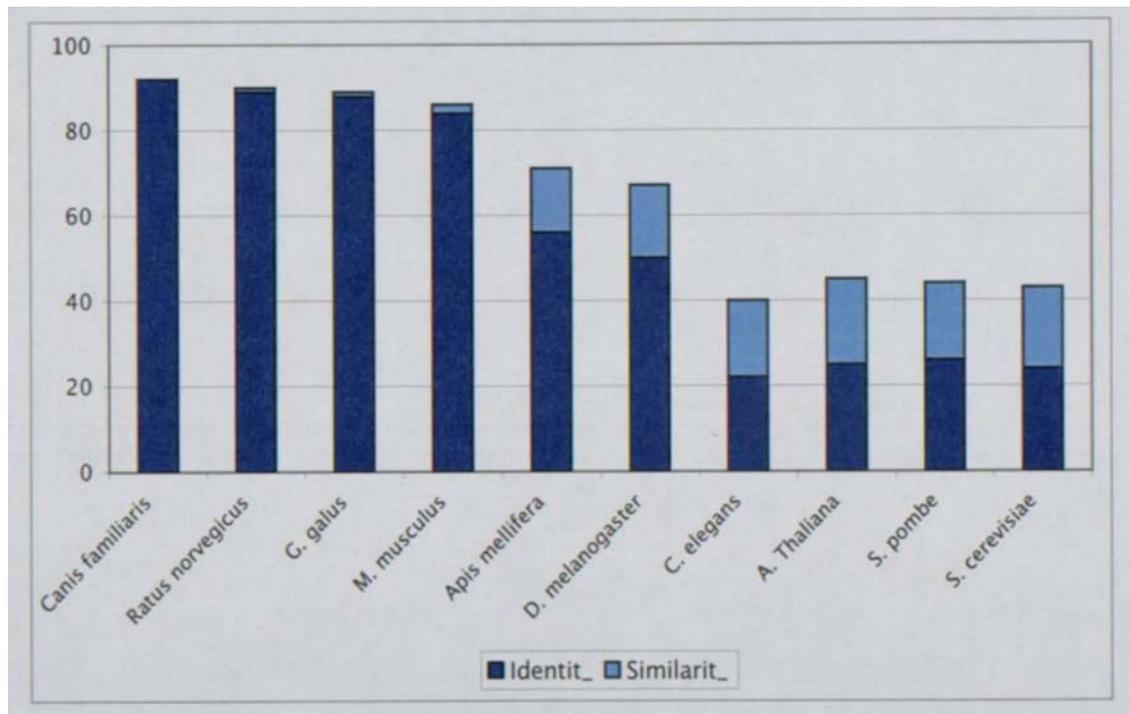
INTRODUCTION CHAPITRE 3 :

TRRAP :

I. Conservation phylogénétique et Structure

L'identification de la protéine TRRAP humaine (TRansactivation /tRansformation domain Associated Protein) résulte d'une expérience visant à isoler un cofacteur majeur et essentiel de l'oncogène *c-Myc* (McMahon *et al.*, 1998). Dans la même année, son homologue Tra1 chez *S. cerevisiae* fut identifié dans un complexe Ada-Spt, qui s'avéra plus tard être le complexe HAT SAGA (Saleh *et al.*, 1998).

TRRAP et Tra1 appartiennent à la famille des ATM/PIKK (phosphatidylinositol 3-kinase like kinase), mais ne sont que peu similaires aux autres PIKK. En effet, l'homologie est restreinte à un fragment de 10 % de la séquence, qui recouvre le domaine kinase des PIKK, à l'extrémité carboxy-terminale. Des homologues de TRRAP/Tra1 existent probablement chez tous les eucaryotes, et ceux qui ont été identifiés partagent de 45% à 90% d'acides aminés similaires (table ci-dessous).



a. Domaines et motifs caractéristiques de la famille TRRAP

Une représentation schématique de la protéine, et des domaines de liaison de ses différents partenaires est donnée par la [Figure 12](#).

La partie carboxy-terminale de TRRAP est occupée par le domaine caractéristique de la famille des kinases ATM/PIKK (phosphatidylinositol 3-kinase like kinase) (McMahon *et al.*, 1998). Cette large famille, décrite plus loin (chapitre IV), comprend des kinases de protéine de haut poids moléculaire. Elles transmettent par une cascade de phosphorylations les signaux de lésions de l'ADN aux points de contrôle

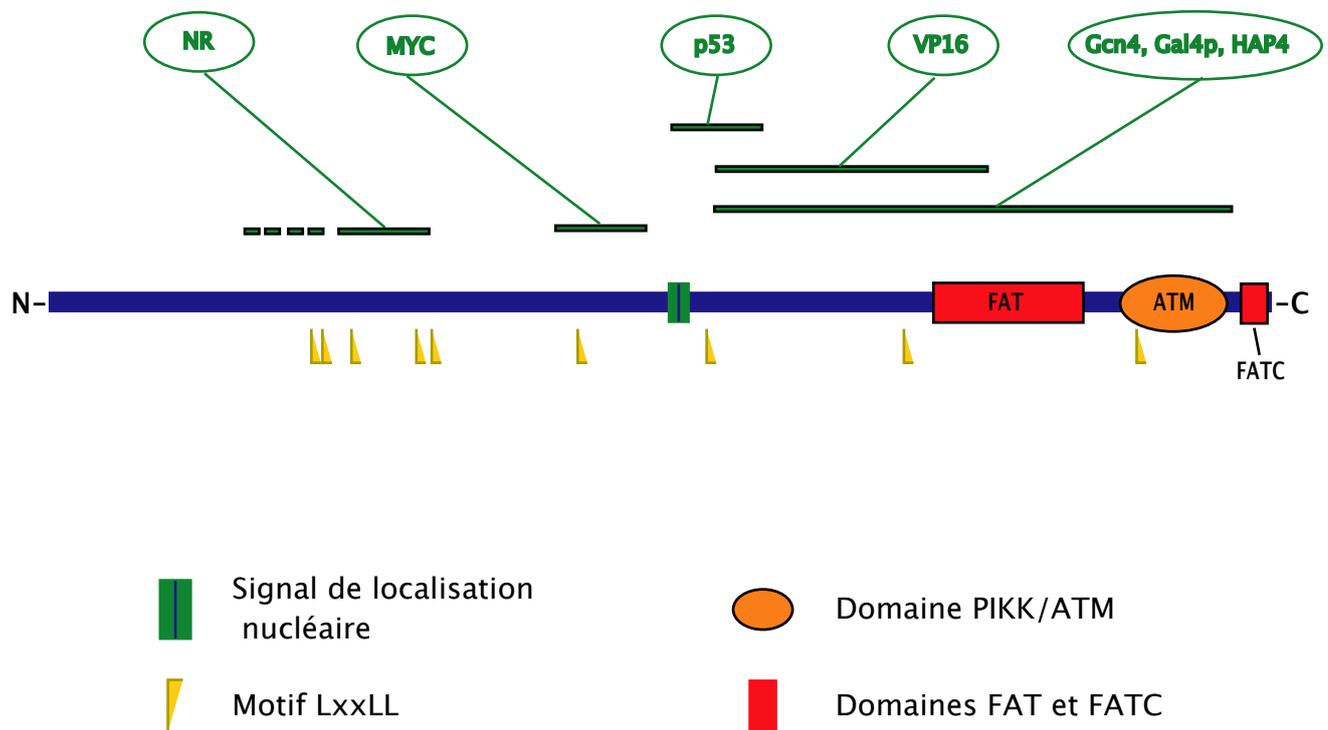


Figure 12 : **Organisation de la séquence de TRRAP/Tra1.**

Les motifs et domaines de la protéine sont schématisés selon la légende donnée. Les barres vertes représentent les domaines d'interaction des activateurs qui reconnaissent Tra1 ou TRRAP.

du cycle cellulaire. Cependant, le site bipartite qui catalyse la phosphorylation par les PIKK n'est pas conservé chez TRRAP et ses homologues. En effet, les séquences essentielles DRHxxN, et TGxDF sont mutées, et TRRAP ne peut probablement pas interagir avec l'ATP. Cependant, une unique expérience d'autophosphorylation a été réalisée à ce jour (*Vassilev et al., 1998*). L'existence d'un co-facteur ou d'un ligand qui restaure l'activité kinase n'est pas exclue, et cette hypothèse mériterait d'être testée.

Le domaine ATM/PIKK est entouré de deux autres motifs conservés : un motif dit FAT (FRAP-ATM-TRRAP domain), et un motif FATC (FAT Carboxy-terminal), tous deux spécifiques des PIKK (Ils ne sont pas présents dans les PI3K, une famille de kinases d'inositol proches des PIKK). Le premier couvre une centaine d'acides aminés assez peu conservés, et n'a pas de fonction précise connue (*Bosotti et al., 2000*). Le second situé à l'extrémité carboxyterminale des protéines représente une trentaine d'acides aminés très conservés. Chez ATM, la sérine 1981 qui est phosphorylée en cas d'activation se situe dans ce domaine. De plus, en cas d'homodimérisation chaque FAT gêne l'activité du domaine kinase du partenaire. Ceci concorde avec une action régulatrice interne du domaine FAT sur le domaine ATM/PIKK (*Shiloh, 2003*). Notons aussi qu'une étude menée sur la DNAPKcs (sous-unité catalytique de la « DNA dependent Protein Kinase ») suggère que les domaines FAT et FATC structure l'entourage du domaine catalytique (*Rivera-Calzada et al., 2005*). Cependant, les régions intermédiaires entre les différents domaines sont très variables d'une PIKK à l'autre : il serait périlleux de prédire la structure du domaine carboxy-terminal de TRRAP au regard de celui de la DNA-PKcs.

9 motifs LXXLLs sont répartis sur toute la séquence de TRRAP, aux positions 843, 877, 984, 1184, 1210, 1714, 2174, 2750, 3548. Une interaction avec le récepteur nucléaire ER α dépend de trois seulement (en position 984, 1184 et 1210) (*Yanagisawa et al., 2002*). Le LXR, particulier au métabolisme des lipides, semble, lui, se lier à une région un peu plus large, incluant 5 motifs potentiels d'interaction (*Unno et al., 2005*).

TRRAP possède aussi un signal de localisation nucléaire (NLS) en 2 parties, entre les acides aminés 2029-2046 (*McMahon et al., 1998*). Malgré cela, une protéine chimère TRRAP-YFP surexprimée dans des cellules de tumeur ovarienne n'entre dans le noyau qu'en présence de Gcn5 (*Fan et al., 2004b*).

Entre les domaines FAT et ATM/PIKK, un motif « leucine zipper » potentiel occupent les acides aminés 3403 à 3424 (*McMahon et al., 1998*). Il se limite à 3 leucines régulièrement placées, sur les 8 nécessaires au motif leucine zipper canonique de surenroulement. Sa présence ne suffit probablement pas aux interactions de TRRAP avec de nombreuses autres protéines.

2 régions TPR, respectivement aa2752-2785 et aa3088-3121 s'ajoutent à cette liste. Les motifs TPR sont fréquents dans la séquence de protéines actives en transcription, régulatrices de kinase, ou plus généralement du cycle cellulaire. ils servent à des interactions protéine-protéine. Cependant, la structure canonique d'un motif d'interaction TPR comprend au minimum 3 répétitions en tandem, ce qui n'est pas le cas pour TRRAP.

De façon surprenante, plusieurs outils informatiques (Prosit Scan et Motif Scan) prédisent un motif signature « Blue Copper » dans le milieu des séquences humaine et murine de TRRAP (2650-2664 GeiSpFICs.GsHqv..Q). L'indice de confiance de cette prédiction est plus élevé que celui du NLS. Les protéines portant ce motif catalysent la réduction du cuivre, et sont caractérisées par une forte absorption à 600 nm, qui leur donnent une couleur bleue (*Gray et al., 2000*). Il semble que les PIKK proches de TRRAP comme ATM, ATR, DNAPKcs et FRAP ne contiennent pas de domaine similaire. Selon la documentation de la banque de donnée Prosit, l'attribution de ce domaine à TRRAP est un faux positif (<http://us.expasy.org/cgi-bin/prosit-search-ac?PS00196>).

Enfin, TRRAP ne semble avoir ni domaine de liaison à l'ADN (McMahon *et al.*, 1998), ni domaine caractéristique de fonctions enzymatiques classiques (hydrolyse de l'ATP, kinase, méthyltransférase, acétyltransférase...). Cependant, une région située entre les acides aminés 400 et 500 est particulièrement riche en proline

Chez la levure, Tra1 pourrait être phosphorylée sur une sérine se trouvant entre les acides aminés 165 et 187 (Saleh *et al.*, 1998). Aucune donnée biochimique ne vient confirmer cette observation faite par spectrométrie de masse, mais l'hypothèse d'une régulation de TRRAP par phosphorylation paraît raisonnable.

Pour finir, TRRAP interagit avec ses différents partenaires avec des domaines variés, qui couvrent dans l'ensemble la moitié carboxy-terminale de sa séquence. On ne peut donc définir de domaine particulier à sa fonction de co-activation. Par exemple, il semble que les acides aminés 1261 à 1579 et 3402 à 3828 soient nécessaires à une transformation optimale par cMyc (McMahon *et al.*, 1998). Au contraire, l'interaction de p53 avec TRRAP requière les résidus 1992 à 2073 (Figure 12).

II. Fonction de co-activation de la transcription

L'intérêt porté à TRRAP vient de son identification en tant que facteur essentiel à l'activation de la transcription par l'oncogène c-Myc. Depuis des interactions similaires ont été mises à jour avec d'autres activateurs tels E2F, E1A, et de nombreux récepteurs nucléaires. Tra1, de son côté, interagit avec des activateurs acides de levure comme Gal4. Si Tra1/TRRAP est un partenaire privilégié de ces facteurs ou co-facteurs de transcription, son implication dans un mécanisme d'activation conservé est très probable. Nous allons voir en effet que l'appartenance de TRRAP à plusieurs complexes de remodelage de la chromatine justifie cette implication. Mais les différents activateurs travaillant en concertation avec TRRAP ont chacun leurs particularités, et influencent l'expression de leurs gènes cibles selon un mécanisme qui n'est pas unique.

a. Co-activation soumise aux activateurs acides

Peu après la purification du complexe HAT SAGA chez *S. cerevisiae*, l'équipe du Dr JL Workman pu montrer sa participation à la régulation de la transcription par l'activateur acide VP16. Le complexe NuA4 ayant un comportement similaire, Tra1p, qui est la seule protéine commune aux deux complexes, était un bon candidat d'interaction avec VP16. Ceci fut vérifié pour les domaines d'activation de VP16, Gcn4, Gal4 et Hap4 surexprimés *in vitro* (Brown *et al.*, 2001). Les autres sous-unités de SAGA et NuA4 ne semblaient pas avoir cette capacité de recruter les activateurs acides. D'autre part, ceux-ci à l'exemple de VP16 n'interagissent pas avec Tra1 si le domaine 2233-2836 est enlevé à cette dernière. Notons enfin que le recrutement de tra1 par l'un de ses activateurs est nécessaire à l'acétylation du promoteur.

Par ailleurs, l'interaction de Tra1 avec un activateur acide est pertinente au niveau physiologique : SAGA interagit avec la séquence régulatrice distale (UAS) du gène Gal1 activé par Gal4p *in vivo*, et cet effet activateur est impossible en son absence (Bhaumik *et Green*, 2001). Ces résultats sont complétés depuis peu par l'observation *in vivo* par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) de l'interaction de tra1 avec Gal4p (Bhaumik *et al.*, 2004).

Cependant, la présence d'une HAT dans le complexe SAGA n'est pas la raison déterminante de son recrutement par l'activateur. En effet, le rôle de SAGA semble être cette fois d'assembler le complexe

de pré-initiation sur le promoteur, et non d'acétyler les histones pour activer la transcription (*Bhaumik et Green, 2001*).

b. Co-activation soumise aux oncogènes et suppresseur de tumeurs

i. Différents activateurs interagissent avec TRRAP

1. c-Myc et ses homologues

Les activateurs de la transcription connus pour se lier à TRRAP sont au nombre de 3 (Myc, E2F et p53), mais cette liste n'est probablement pas close.

a. TRRAP/cMyc et l'activation de la transcription des gènes de classe II

Un ensemble conséquent de résultats montre que TRRAP participe à l'établissement par les activateurs de la famille Myc d'un certain programme transcriptionnel, qui aboutit à l'immortalisation ou au suicide de la cellule. c-Myc, N-Myc et L-Myc sont des facteurs de transcription qui reconnaissent un motif donné du promoteur (la « E-box », de séquence consensus CACGTG) sous forme d'hétérodimères Myc/Max (pour une revue (*Luscher, 2001*)). Ils activent alors la transcription du gène au travers d'un remodelage drastique de la chromatine, menés par les complexes SWI/SNF, NuA4/TIP60 et SAGA/TFTC, et probablement des facteurs encore inconnus.

TRRAP interagit avec le domaine amino-terminal de c-Myc *in vitro*, et son recrutement sur la chromatine suite à l'activation de c-Myc par un mitogène a été observé *in vivo* (*Frank et al., 2001*). Il est concomitant de l'acétylation de l'histone H4, et de l'activation du gène en question. Des études plus récentes ont montré que c-Myc est présent *in vivo* sur la chromatine avec TFTC/STAGA/PCAF et TIP60/p400 (*Flinn et al., 2002 ; Frank et al., 2003 ; Liu et al., 2003*)

L-Myc et N-Myc interagissent aussi avec TRRAP. Cependant, l'interaction L-Myc/TRRAP est plus faible que ses homologues, ce qui concorde avec le caractère moins oncogène de L-Myc (*Nikiforov et al., 2002*).

Le domaine d'interaction de c-Myc avec TRRAP semblait dans les premières études recouvrir la partie amino-terminale de c-Myc appelé TAD (TransActivation Domain). Plus précisément, le domaine nécessaire à la transformation, MBII (Myc box II), serait indispensable à l'immunoprécipitation de TRRAP (*McMahon et al., 1998*).

Cependant, une étude plus récente, basée sur un système d'activation ectopique chez la levure, contredit cette observation. Elle montre que la boîte MBII n'est pas nécessaire à l'activation d'un gène PHO5 par c-Myc, ni au remodelage de la chromatine autour de son promoteur *in vivo* (*Flinn et al., 2002*). *In vitro*, MBII n'interagit qu'avec un complexe Ada purifié, et non avec SAGA et NuA4, ou SWI/SNF. La région requise pour ces trois derniers complexes de remodelage de la chromatine semble inclure les acides aminés 66 à 127 qui se situent entre les deux boîtes MB de c-Myc.

Cette contradiction apparente peut être expliquée par l'incompatibilité d'un activateur exogène avec les facteurs de remodelage de la levure. De plus, les expériences d'interaction *in vitro* de Flinn et al mettent en jeu des complexes hors de leur contexte. Elles ne permettent pas d'exclure l'hypothèse qu'un extrait nucléaire contienne des facteurs non identifiés qui ciblent l'interaction TRRAP/c-Myc sur la boîte MBII, et qui soient absents de SAGA et NuA4 purifiés.

Plusieurs exemples de régulation spécifiques de gène cible via TRRAP ont été rapportés :

La capacité de c-Myc à transformer des cellules saines en cellules tumorales dépend de son action sur l'expression de certains facteurs clés des points de contrôle du cycle cellulaire. Ainsi, la cycline D2 qui orchestre la décision d'entrée en phase S, est surexprimée durant le processus de transformation par c-Myc. Son promoteur sur lequel c-Myc se lie est fortement acétylé, et TRRAP y est présent de façon dépendante de la boîte MBII (*Bouchard et al., 2001*).

TRRAP et ses partenaires co-activent la transcription déclenchée par c-Myc du gène TERT, codant pour une télomérase. Ce gène ne peut être activé *in vivo* que par c-Myc et non E2F et E1A, qui pourtant fonctionnent pour d'autres promoteurs de la même façon que c-Myc. Le gène TERT est d'autant plus intéressant qu'il est surexprimé dans la grande majorité des tumeurs humaines. Cependant, c-Myc n'a d'effet activateur que sur TERT réprimé, et non un gène déjà actif, comme dans des cellules immortalisées en croissance exponentielle. L'étude de Nikiforov *et al.* démontre que l'acétylation d'H3 et H4 par des HATs recrutées via TRRAP sur le promoteur de TERT est nécessaire à son activation, et, de façon concordante, n'intervient que sur un promoteur TERT au préalable « silencieux » (*Nikiforov et al., 2002*). Cette observation indique l'existence d'un contrôle rétroactif, qui limite le recrutement des complexes HAT sur un promoteur déjà acétylé. Ce contrôle implique très probablement le code histone.

b. TRRAP/cMyc et la transcription des ARN ribosomaux par l'ARN pol I

Le mécanisme de transactivation par TRRAP, en réponse aux activateurs oncogéniques (c-Myc, E1A/E2F) est plus conservé qu'on ne le croyait originellement. Il est retrouvé dans la transcription par l'ARN polymérase I des ARN ribosomaux (*Arabi et al., 2005*). La partie codante de l'ADN ribosomique contient en effet de nombreuses E-box, canoniques ou très proches du consensus. Le recrutement de c-Myc et TRRAP sur l'ADNr actif est observé *in vivo* dans le même temps que la région active est acétylée et transcrite. La régulation finale des ADN ribosomiques semblent soumise à l'activité du protéasome qui maintient dans une cellule quiescente c-Myc à un niveau très faible.

c. C-Myc active la transcription sans TRRAP.

TRRAP joue un rôle prépondérant dans l'activation par c-Myc, mais n'est pas pour autant le facteur limitant. Après séquestration de TRRAP et Gcn5 par E1A, la réintroduction de Gcn5 suffit à restaurer l'effet de c-Myc sur un gène rapporteur (*Lang et Hearing, 2003*). L'HAT pourrait donc agir sans TRRAP, ou à l'aide d'autres partenaires.

Par ailleurs, le mécanisme de co-activation par les complexes TRRAP-HAT des gènes sensibles à c-Myc n'est pas universel. En effet, c-Myc dépourvu de la zone de liaison de TRRAP autour de la boîte MBII peut activer la transcription d'un gène rapporteur. Cet effet est augmenté par la présence de CBP ou p300 (*Vervoorts et al., 2003*). L'oncogène a donc la capacité d'amener sur le promoteur d'autres HAT que celles liées à TRRAP. Une autre possibilité est que certains promoteurs puissent être activés par c-Myc en l'absence d'HAT. Néanmoins, il est difficile de dire si CBP/p300 est recruté seul ou accompagné d'autres co-activateurs.

2. E2F

L'intervention d'enzymes HAT dans l'activation des gènes dépendant des facteurs de transcription E2F est prouvée. En effet, la répression de ces gènes dépend de l'action sur leurs promoteurs des déacétylases et du complexe SWI/SNF, recrutés par les répresseurs Rb (*Harbour et Dean, 2000*).

Il a été montré que TRRAP intervient dans l'activation de ces gènes de la même façon qu'avec c-Myc : E2F-1 et E2F-4 interagissent avec un complexe TRRAP-GCN5 *in vivo*, et l'activité HAT de GCN5 est nécessaire à l'activation du gène rapporteur (*Lang et al., 2001*).

De la même façon, le recrutement d'un complexe TRRAP/TIP60 et l'acétylation de l'histone H4 ont été observés par immunoprécipitation de chromatine *in vivo* sur un promoteur cible d'E2F (*Taubert et al., 2004*).

3. p53

De la même façon que les oncogènes c-Myc et E1A, la protéine p53 active la transcription de gènes spécifiques, qui dirigent la cellule vers l'apoptose. Ceci fait de p53 un gène dit suppresseur de tumeur (*Vogelstein et al., 2000*). TRRAP est aussi un co-activateur de p53. Tous deux interagissent *in vitro* et *in vivo* sur un promoteur (*Ard et al., 2002*). De plus, la présence de TRRAP favorise l'acétylation d'H3 et H4, et active la transcription du gène *mdm2* régulé par p53. Par ailleurs, p53 est un substrat des HAT Gcn5 et Pcaf qui interagissent avec TRRAP (*Liu et al., 1999*). Cependant, Ard et al. ont fait la preuve que l'acétylation de p53 n'influence pas la transcription co-activée par TRRAP/GCN5 ou TRRAP/Pcaf.

Un aspect particulier de ce mécanisme de co-activation est le rôle du domaine carboxy-terminal de TRRAP. Il est démontré que les domaines ATM et FAT sont nécessaires à un effet optimal. De façon surprenante, le site de liaison de p53, situé entre les résidus 1992 et 2073, est proportionnellement moins influent.

ii. Redondance avec Tip49

TRRAP et Tip49 semblent assurer des rôles redondants dans l'activation de gènes par les oncogènes Myc et E2F. Tous deux interagissent avec c-Myc, N-Myc et L-Myc d'une part (*McMahon et al., 1998 ; Nikiforov et al., 2002*), et E2F1 d'autre part (*Dugan et al., 2002 ; Lang et al., 2001*). De plus, TRRAP et Tip49 sont associés dans au moins deux complexes dotés d'activités enzymatiques différentes, le complexe de remodelage dépendant de l'ATP p400, et le complexe HAT TIP60.

Cependant, les associations c-Myc/TRRAP et c-Myc/Tip49 ne semblent pas avoir la même influence sur le programme transcriptionnel et le destin de la cellule. Le recrutement de TRRAP sur un ensemble de promoteurs par c-Myc résulte dans la transformation oncogénique de la cellule. Au contraire, si c-Myc recrute Tip49, la cellule peut être dirigée vers un processus apoptotique ou immortalisée (*Dugan et al., 2002*).

L'existence d'une association Tip49-Tip48-BAF53 indépendante de TRRAP, et dépourvu d'activité HAT a été rapportée (*Park et al., 2002*). Elle pourrait expliquer les conséquences différentes du recrutement par c-Myc de TRRAP et Tip49.

c. Co-activation soumise aux récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires, comme d'autres facteurs de transcription, régulent la transcription de leurs gènes cibles par le biais de co-facteurs. Ceux-ci agissent par leurs rôles enzymatiques sur l'environnement du site d'initiation de la transcription. Ainsi, p300/CBP et les HAT du type p160 (SRC-1,

TIF2...) sont des co-facteurs connus des NR (*Torchia et al., 1997*), de même que certaines formes purifiées du complexe « Médiateur » (DRIP/TRAP/SMCC) (*Rachez et al., 1999*). Plus récemment, les complexes HAT incluant TRRAP ont aussi été impliqués dans la régulation dépendante des NR.

En effet, le domaine AF2 d'ER α , en présence de son ligand, est en interaction avec un complexe de type TFTC (*Yanagisawa et al., 2002*). TRRAP est la cible d'ER α dans le complexe, mais aussi d'ER β , VDR, et PPAR γ . La présence de TRRAP et GCN5 renforce très nettement l'effet d'activation dû à ces récepteurs sur des promoteurs cibles dans un test d'expression transitoire. *In vivo*, leur recrutement sur les gènes activés par ER α est très fortement augmenté par le ligand.

De façon similaire, l'inactivation de TRRAP *in vivo* réduit significativement le potentiel de trans-activation des récepteurs nucléaires du métabolisme des lipides, LXR et FXR. TRRAP est donc aussi un co-activateur de ces NR, mais l'interaction se fait dans ce cas via plusieurs LXXLL dans la région 581 à 1394, de façon ligand dépendante. Il a été montré aussi que LXR interagissait avec TRRAP via le domaine PI3kinase, mais de façon indépendante du ligand, ce qui dénote un mode de régulation particulier (*Unno et al., 2005*).

Mis à part cette particularité, la trans-activation par les récepteurs nucléaires applique apparemment un schéma conservé dans lequel TRRAP assure un rôle précis. Sa présence est liée à celle d'une enzyme HAT et à l'acétylation des histones. Une illustration complémentaire vient de l'étude récente du récepteur AD4bp/SF1. Il s'agit d'un NR orphelin, nécessaire à la régulation du développement génital (gonades, hypothalamus) (*Fan et al., 2004b*). Son effet sur un gène cible est augmenté en présence de TRRAP et GCN5, et sa forme active colocalise avec eux dans le noyau.

d. E1A séquestre TRRAP pour transformer les cellules

La protéine d'adénovirus E1A agit à l'encontre des activateurs c-Myc et E2F. Elle retient leurs co-facteurs, comme p300/CBP et PCAF (*Yang et al., 1996*), et les empêchent d'activer normalement la transcription de leurs gènes cibles. Ainsi les gènes qui régulent en temps normal le cycle cellulaire et la différenciation sont anormalement exprimés, ce qui entraîne la transformation cancéreuse de la cellule. E1A est donc considéré comme un facteur oncogène extérieur, qui agit différemment d'E2F et c-Myc (pour une revue (*Mymryk et Smith, 1997*)).

TRRAP interagit avec E1A autant dans le complexe p400/Tip60 que dans un complexe de type TFTC (*Fuchs et al., 2001 ; Lang et Hearing, 2003*). De façon similaire, E1A co-précipite *in vivo* l'ensemble du complexe SAGA chez *S. cerevisiae* (*Kulesza et al., 2002*), et son effet compétiteur concerne spécifiquement SAGA, et non le complexe apparanté ADA dépourvu de TRRAP (*Shuen et al., 2002*). Les dernières études à ce sujet montrent que l'interaction de TRRAP/GCN5 *in vivo* avec E1A limite l'activation de la transcription due à c-Myc et E2F (*Lang et Hearing, 2003*).

L'effet d'E1A sur ces facteurs de transcription est reproduit de façon similaire sur la transcription soumise à p53. La rétention de TRRAP/p400 permet à E1A de limiter l'expression des gènes qui promeuvent l'apoptose des cellules (*Hobom et Dobbstein, 2004*). Cet ensemble de mécanisme tend à favoriser la prolifération des cellules, et par là même la réplication du virus dans un processus d'infection.

Ainsi, l'action de transformation d'E1A repose sur la séquestration de TRRAP, qui a pour conséquence de déréguler la transcription de gènes normalement activés par p53, c-Myc ou E2F.

e. Un mécanisme commun de trans-activation ?

L'ensemble des résultats ci-dessus dessine un mode d'activation de la transcription partagé par de nombreux activateurs. Qu'il s'agisse de c-Myc, p53 ou E2F, la reconnaissance d'un élément distal du promoteur déclenche dans de nombreux cas le recrutement d'un complexe contenant TRRAP et une activité de remodelage de la chromatine. Celle-ci peut être une histone acétyltransferase, ou une ATPase capable de mouvoir les nucléosomes. Elle agit sur l'entourage du promoteur, et facilite l'accès de la machinerie de transcription. Ainsi le gène est transcrit à un niveau plus élevé en réponse à l'activateur.

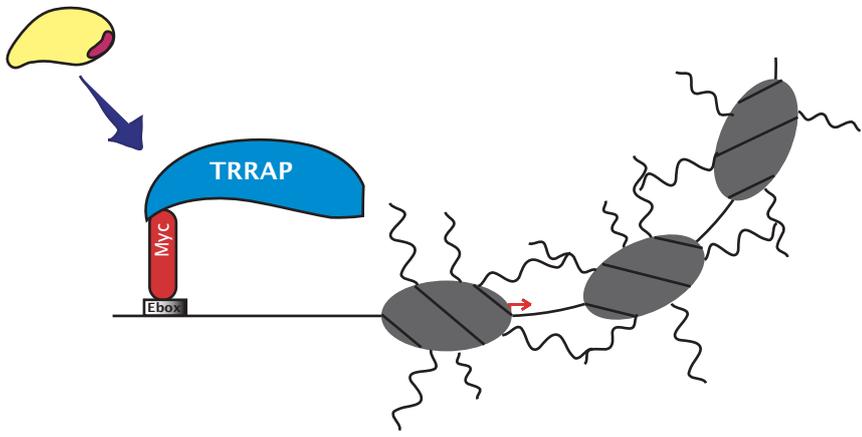
Ce modèle est conforté par l'implication de complexe TRRAP/HAT dans l'activation par d'autres activateurs. Ainsi, un complexe TFTC like, et plus particulièrement GCN5, est la cible du facteur de transcription STAT2 (Paulson *et al.*, 2002). Celui-ci régule la voie de réponse antivirale des interférons (IFN), et permet d'activer la transcription de gènes important pour cette réponse, malgré l'absence de TBP, séquestrée par certaines protéines virales. Rien ne permet d'affirmer qu'*in vivo* TRRAP serve de pont entre STAT2 et Gcn5 comme pour c-Myc et E2F, mais ce la est probable.

L'ensemble des données disponibles permettent de proposer un modèle d'activation de la transcription par un activateur, dans lequel TRRAP joue un rôle central (Figure 13). Lié à l'activateur, qui a reconnu son site de liaison sur ADN, TRRAP est un intermédiaire pour le recrutement des enzymes nécessaires à l'ouverture du promoteur. Ceux-ci interviennent avec leur co-facteurs sur les histones ou sur les nucléosomes, tandis que TRRAP les retient sur le site. Des données récentes suggèrent que le processus décrit soit séquentiel et ordonné (Memedula *et Belmont*, 2003), ce qui permet de le découper en plusieurs étapes : le recrutement de TRRAP, puis d'un ou plusieurs complexe(s) HAT, puis d'un complexe de remodelage, et enfin l'arrivée de la machinerie de transcription (Figure 13). Dans ce modèle, TRRAP serait présent tout le temps où les HAT se succèdent.

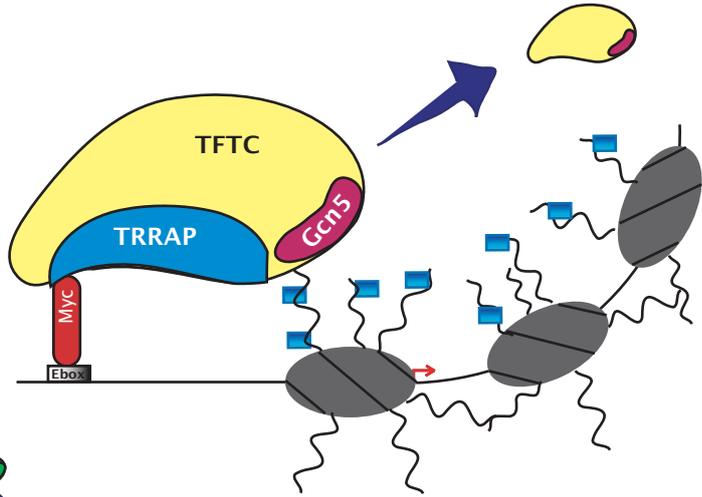
Cependant, il ne s'agit pas d'un mécanisme universel. c-Myc par exemple peut se passer de TRRAP. Certains gènes soumis à l'activation par un même activateur semblent régulés préférentiellement par d'autres facteurs (TIP49 par exemple). De la même manière, SAGA peut participer à l'activation par le récepteur nucléaire aux hormones thyroïdes (TR), sans pour autant que Tra1 soit impliquée. L'activité TR et ses co-activateurs GRIP1 et SRC-1 est dépendante dans ce cas de Gcn5 et des ADA (Anafi *et al.*, 2000).

Par ailleurs, il existe des modulations fines de l'état d'acétylation, dont l'origine n'est pas connue. Par exemple, certains promoteurs activés sont acétylés préférentiellement sur H4. Malgré cela, TRRAP ne semble pas recruter préférentiellement une HAT ou une ATPase en fonction de l'activateur qui la contacte. L'intervention de partenaires de TRRAP pourrait expliquer le recrutement préférentiel de telle ou telle enzyme. Un bon candidat pourrait être BAF53, l'homologue humain de *scArp4*, qui est aussi essentiel à la co-activation par c-Myc via l'acétylation des histones autour du promoteur. Cependant, l'HAT qui acétyle H4 dans les études décrites par Park *et al.* ne semble pas être Tip60p (Park *et al.*, 2002), ce qui suggère que le complexe TIP60 ne soient pas le co-activateur comprenant BAF53 et TRRAP suffisant à acétyler H4 et activer le promoteur.

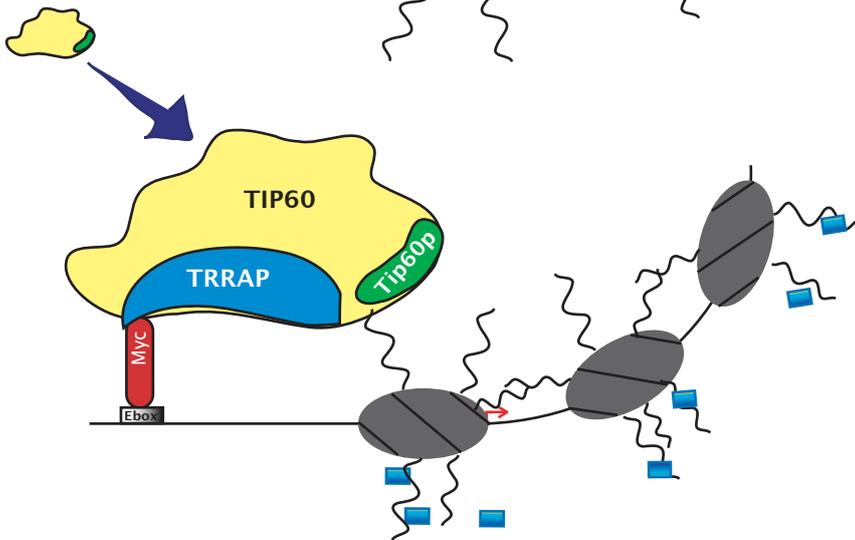
Une autre hypothèse serait que l'état d'acétylation d'un promoteur est déterminé par l'action synergétique de plusieurs co-facteurs HAT. Une coopération de ce type a été décrite entre TFTC et p300 dans l'activation par VP16 d'un promoteur (Hardy *et al.*, 2002).



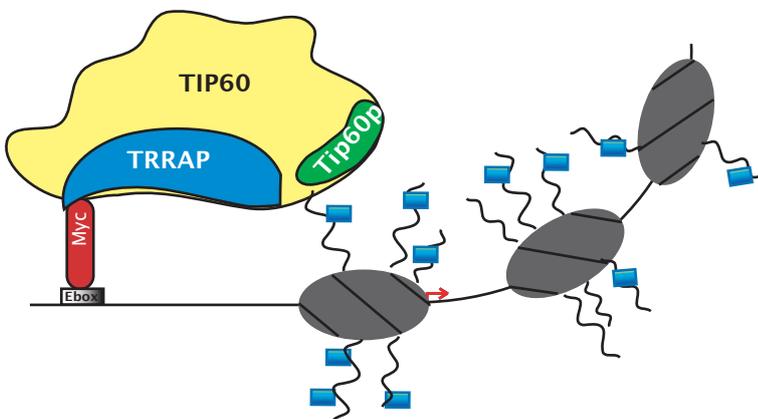
1 : TRRAP est le premier facteur présent sur le promoteur, en interaction avec l'activateur. Il permet le recrutement de TFTC, ce qui place Gcn5 à proximité des queues d'histones.



2 : Gcn5 acétyle H3 ce qui diminue les interactions inter-nucléosomes. TFTC laisse TRRAP sur l'activateur, et peut éventuellement acétyle d'autres sites.



3 : Le complexe TIP60 est recruté de la même façon que l'a été TFTC. Ces deux événements pourraient être inversés, ou cycliques.



4 : Tip60p acétyle H4 ce qui favorise encore le relâchement des interactions inter-nucléosomes.

Figure 13A : Modélisation de l'ouverture d'un promoteur coordonnée par TRRAP et un activateur

III. Données de délétion *in vivo* du gène *trrap* :

Dès la découverte du co-facteur Tra1, il a été montré qu'il s'agissait d'une protéine essentielle : les souches de *S. cerevisiae* KO pour *tra1* ne prolifèrent pas et meurent rapidement (Saleh *et al.*, 1998).

De même chez les mammifères, le gène *trrap* est essentiel : sa désactivation chez la souris est létale, car elle entraîne un défaut d'implantation de l'embryon au stade blastocyste (Herceg *et al.*, 2001). Les quelques embryons *trapp*^{-/-} qui peuvent être isolés 3,5 jours après fécondation sont retardés et ne forment pas de « masse cellulaire interne » (Inner cell mass, ICM). Au contraire, des souris *trrap*^{+/-} se développent normalement, ce qui laisse de côté l'hypothèse d'un effet de dosage.

A l'évidence, l'étude de la fonction du gène *trrap* ne pouvait être menée sur un organisme. L'équipe du Dr Wang a donc génétiquement transformé des cellules souches embryonnaires de souris de façon à générer un KO conditionnel de TRRAP. Des sites de clivage de la recombinaison CRE furent introduits dans la séquence de *trrap* dans le même temps qu'une séquence codant pour la CRE recombinaison mutante fut additionnée au génome. Cette recombinaison est fusionnée à un domaine de liaison au ligand (LBD) d'ER mutant qui réagit uniquement au 4-hydroxytamoxifène (OHT). Ceci permet d'activer spécifiquement la CRE par un traitement à l'OHT, et de déclencher ainsi l'excision d'une partie du gène : en 48h, la protéine a disparu.

La première observation faite sur ces cellules est qu'elles ne peuvent suivre un cycle cellulaire normal. En effet, les chromosomes se ségrègent mal, forment des ponts, ou se cassent durant la mitose, du fait probablement de faisceaux mitotiques fragiles ou non fonctionnels. Malgré cela, les cellules peuvent entrer en anaphase, et finir la mitose jusqu'à initier un nouveau cycle de réplication de l'ADN. De plus, le niveau d'activité de la kinase cdk1 est anormalement bas. Cette kinase régulée par phosphorylation est indispensable à l'entrée en phase S et à la progression en phase M (Herceg *et al.*, 2001).

Plus globalement, l'analyse par criblage du niveau d'expression des gènes en l'absence de *trrap* montre une forte dérégulation de l'expression génique. Une grande majorité des gènes dérégulés est réprimée (Herceg *et al.*, 2003). Parmi eux, les facteurs d'élongation, de réplication et les régulateurs du cycle cellulaire sont nombreux. Notons ici que ce sont aussi des cibles privilégiées des oncogènes c-Myc ou E2F (Guo *et al.*, 2000). L'appartenance de TRRAP aux mêmes voies de régulation que ces activateurs est donc confirmée par la génétique. De même, les promoteurs des gènes réprimés sont en moyenne moins acétylés, ce qui conforte l'hypothèse d'un recrutement des HAT avec TRRAP. Cependant, des nuances apparaissent en fonction du cycle cellulaire et du promoteur, suggérant que TRRAP régule l'expression des gènes en réponse à des signaux différents, au sein d'un réseau complexe.

Par ailleurs, il a été noté que les cellules *trrap*^{-/-} ne répondent pas correctement à un traitement qui dépolymérise les fuseaux mitotiques : elles se dirigent vers la sortie de mitose, en diminuant l'expression de Securin et Cyclin B, deux facteurs essentiels au blocage de la mitose, et que le traitement de dépolymérisation des fuseaux maintient normalement en grande quantité. Les travaux de Li *et al.* montrent que

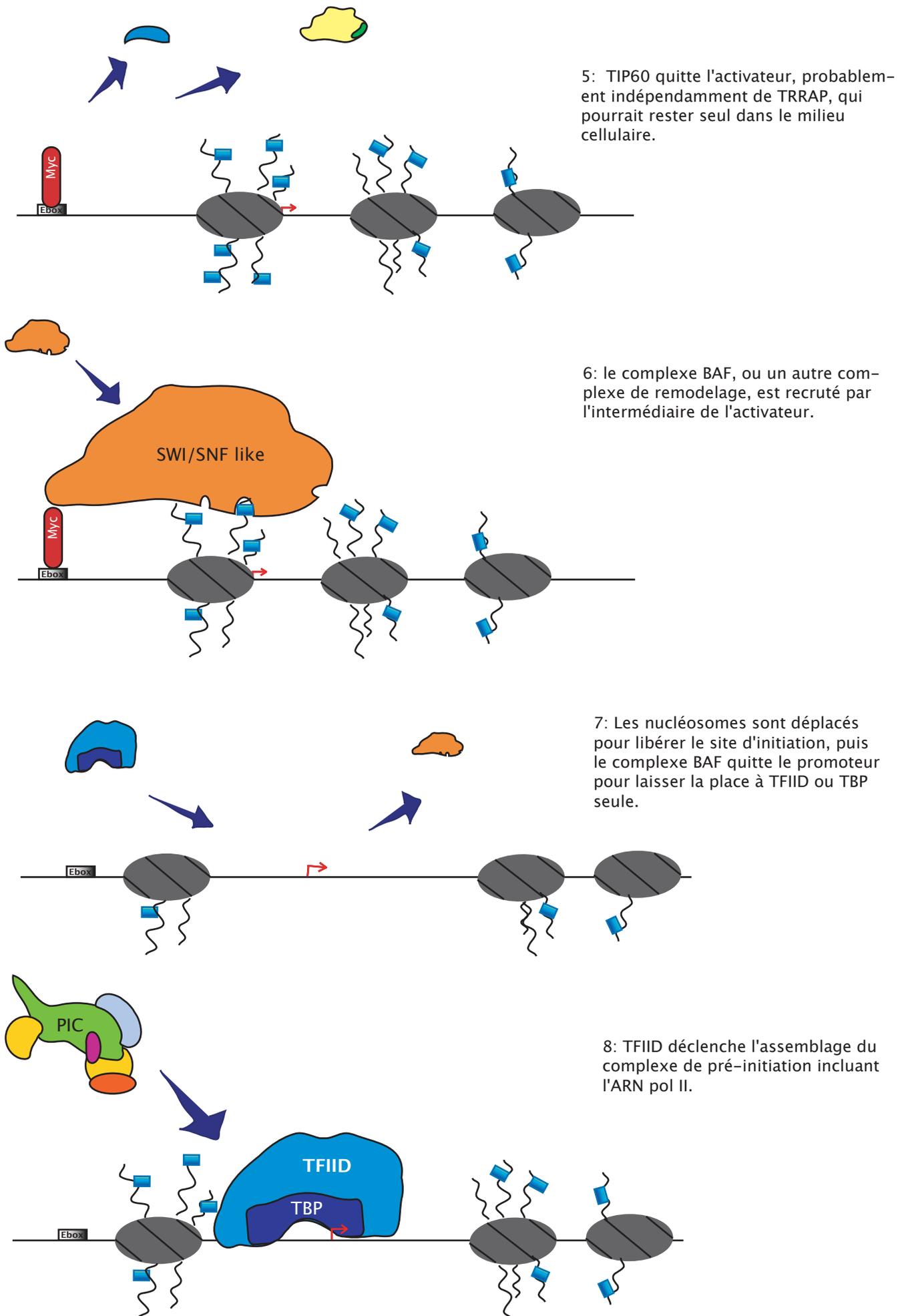


Figure 13B : Modélisation de l'ouverture d'un promoteur coordonnée par TRRAP et un activateur.

à la dérégulation spécifique des protéines Mad1 et Mad2, consécutive à l'absence de trrap (*Li et al., 2004*). En temps normal, les protéines Mad empêchent la séparation des chromatides homologues, car elles bloquent le complexe dit de « promotion de l'anaphase » (APC). Leur titrage est déterminant pour l'activation du point de contrôle intra-mitotique (*Musacchio et Hardwick, 2002*). Si TRRAP est absente, les niveaux d'acétylation respectivement de H4 en phase G2/M sur le promoteur *mad2*, et d'H3 en phase G0/G1 et S sur le promoteur *mad1* sont largement diminués. Les deux protéines sont nettement moins exprimées dans tous les cas. Enfin, la finesse et l'intérêt de cette étude résident dans l'observation d'un recrutement différentiel par TRRAP des HAT spécifiques de H4 et H3, en fonction du promoteur et de l'étape du cycle cellulaire.

Le modèle de trans-activation régulée via TRRAP est renforcé par ces observations *in vivo*. En effet, l'absence de ce facteur essentiel déclenche des conséquences similaires à ce qui est observé en l'absence d'un activateur (c-Myc (*Guo et al., 2000*), E2F, etc...) avec qui il interagit. L'une comme l'autre, dans des conditions endogènes autant qu'ectopiques, résulte dans la dérégulation de l'acétylation locale de promoteurs spécifiques, et l'expression anormale d'un ensemble de protéines.

Chez *C. elegans*, la classe de gènes C synMuv, impliqués dans la différenciation sexuelle de cet hermaphrodite, code pour des homologues de TRRAP, Tip60, Ep(C) et p400. Leurs inhibitions respectives indiquent une interaction génétique du complexe *ceNuA4* à la fois avec la voie de signalisation Ras, et avec un complexe HDAC représenté par le gène LET-418 de la classe B synMuv, qui code pour un homologue de Mi-2 (NurD complex) (*Ceol et Horvitz, 2004*). Cette étude récente montre par ailleurs que l'homologue de TRRAP de cet invertébré est exprimé dans tous les tissus au cours du développement et se localise dans les noyaux.

Dans l'ensemble, les études génétiques de TRRAP et ses homologues confirment les résultats d'interaction et d'activation de la transcription. Cependant, elles montrent aussi que TRRAP ne peut être considérée uniquement comme un co-activateur. En effet, un effet répresseur direct ou indirect existe, puisqu'un certain nombre de gènes sont plus exprimés en son absence (*Herceg et al., 2003*). D'autre part, l'homologue de *C. elegans* interagit génétiquement avec une déacétylase (*Ceol et Horvitz, 2004*).

IV. CONCLUSION :

Un rôle assez précis de la protéine TRRAP se dessine aujourd'hui : elle est un co-facteur de transcription, qui n'agit pas directement sur le promoteur, ni sur les nucléosomes. Son recrutement est dû à un activateur qui reconnaît une séquence spécifique du promoteur. Ces activateurs sont nombreux et divers, et leurs domaines d'interaction avec TRRAP ne se superposent pas. La disponibilité de ces différents domaines pour se lier à d'autres facteurs pourrait dépendre de l'activateur, qui déterminerait ainsi quels partenaires de TRRAP sont recrutés sur le promoteur. TRRAP, qui est présente dans au moins trois complexes humains distincts, amène avec elle des facteurs divers. Une activité de remodelage de la chromatine est présente dans tous les complexes identifiés à ce jour. Le rôle de co-activation de TRRAP tient essentiellement à ce comportement de plateforme entre activateurs et facteurs de remodelage, mis en valeur dans le modèle de la [Figure 13](#).

Un tel modèle est conforté par les observations *in vivo* de Memedula et al. : le recrutement de TRRAP et ses partenaires sur un promoteur artificiel soumis à l'activateur VP16 est séquentiel et coordonné (*Memedula et Belmont, 2003*). TRRAP est présente sur le promoteur avant les activités

d'acétylation et de remodelage dépendantes de l'ATP. Ces dernières se succèdent et l'action de chacune contribue à une activation maximale de la transcription du gène.

Mais ce modèle pourrait être remis en cause dans certains cas précis. Par exemple chez la levure, SAGA a la capacité d'activer un gène en réponse à l'activateur Gal4p, sans que l'activité HAT de Gcn5 soit impliquée. D'autre part, l'activateur c-Myc peut compter sur d'autres voies d'activation, indépendantes de TRRAP, comme le montre les travaux de Dugan *et al.* sur Tip49 (*Dugan et al., 2002*).

Enfin, les connaissances actuelles ne permettent pas d'expliquer comment un activateur donné favorise l'acétylation de H4 par rapport à H3, ou inversement, autour d'un promoteur. Est-ce la supériorité en nombre de complexes TRRAP/Gcn5 (TFTClike) ou TRRAP/Tip60p (NuA4) qui détermine le recrutement de l'un et l'acétylation préférentielle d'une histone ? le choix peut aussi être dirigé par l'activateur, TRRAP peut être la cible de régulation par des modifications post-traductionnelles, qui susciteraient la formation sur le gène d'un complexe plutôt qu'un autre.

INTRODUCTION CHAPITRE 4 :

REPARATION DES CASSURES DOUBLE-BRIN DE L'ADN

I. Introduction : L'importance de maintenir l'intégrité du génome

La molécule d'ADN est fragile et particulièrement sujette aux dégradations. Celles-ci sont à l'origine des mutations qui ont permis l'évolution et la diversification des espèces. Cependant, l'accumulation de dommages de l'ADN conduit à la transformation cancéreuse ou à la mort cellulaire. Leur occurrence naturelle très élevée (parfois plusieurs dizaines de milliers de fois par jour et par cellule) doit être contrecarrée pour que chaque individu survive. Chez les eucaryotes, plusieurs mécanismes spécifiques sont dédiés à la réparation des différents types de lésions. L'inhibition de gènes liés à ces mécanismes entraîne des phénotypes létaux, ce qui montrent leur caractère essentiel. Par ailleurs, les mutations hypomorphiques de ces mêmes gènes sont responsables de maladies génétiques graves.

Nous verrons dans ce chapitre quelles sont les causes, exogènes ou endogènes, des dommages subits par l'ADN. Nous distinguerons parmi eux les cassures double brin (Double Strand break, DSB), et les réponses spécifiques apportées par la cellule à ce type de dommage. Les différents mécanismes de réparation de DSB seront détaillés, afin de mettre à jour le rôle central du complexe MRN dans les étapes essentielles de détection, signalisation et réparation. Enfin, une dernière partie est consacrée aux connections entre les processus de réparation, de transcription et d'organisation de l'ADN qui sont au centre de ce travail.

II. Les causes de cassures double brin de l'ADN : rôle biologique et caractère pathogène.

a. Les causes exogènes

Parmi les dommages causés, la coupure simultanée des deux brins appariés est la plus dangereuse pour la cellule, car le risque de dispersion des fragments de chromosomes est important. De plus, le nombre de phénomènes capables d'endommager ainsi la molécule d'ADN est impressionnant. Ils passent par des modifications de bases, des ponts covalents entre brins hybridés, et des cassures simples brins qui peuvent s'aggraver en DSB.

Certaines molécules électrophiles porteuses de fonctions alkyl ont une grande affinité pour les atomes d'azote des bases puriques et pyrimidiques. Les alkylations qui en résultent peuvent créer des mutations ponctuelles, mais aussi déstabiliser la liaison entre deux nucléotides. L'action d'un agent alkylant génère donc des mutations, des cassures simple brin et des DSB. Les tensions reportées sur un brin ou le passage de la machinerie de réparation peuvent par la suite transformer la cassure simple en DSB. Le Méthylméthane Sulfonate (MMS), par exemple, fait partie de ces agents alkylants, et est utilisé en laboratoire pour étudier les conséquences de DSB au niveau cellulaire. Par ailleurs, il est avéré que de nombreux agents alkylants pénètrent dans l'organisme par les voies aéro-digestives. Certains sont présents dans la fumée de cigarette, et expliquent le caractère cancérogène du tabac.

Les radiations ionisantes sont une autre source externe de dommages. Elles agissent directement ou

indirectement sur l'ADN. Dans le premier cas, elles provoquent la formation de radicaux sur les sucres qui constituent la chaîne d'ADN. Dans le second, la radiolyse des molécules d'eau de la cellule génère des ions radicaux, qui eux-mêmes vont agir sur les ponts phosphodiester entre les nucléotides. Si deux radicaux agissent à peu de distances sur deux brins différents d'une même chaîne d'ADN, elle peut être rompue. Ainsi, les DSB sont les dommages majoritaires causés par les rayons gamma (haute énergie).

b. Les causes endogènes

La double hélice est fréquemment endommagée de façon fortuite et sans intervention d'événement extérieur. Nous ne décrirons pas en détail les causes nombreuses de lésions simple brin de l'ADN, mais retiendrons que sa stabilité est mise à mal par l'énergie thermique du milieu cellulaire, et la présence d'oxygène libre (ions hydroxyde et peroxyde par exemple). Ces formes chimiques hautement réactives sont des sous-produits de la respiration oxydative et du métabolisme des lipides. Des processus évolués existent pour réparer rapidement ces différentes lésions des bases par oxydation (dépurination, désamination, dimère de thymine). Ils consistent à remplacer un nucléotide ou simplement une base par excision (« Nucleotide Excision Repair » ou « NER, Base excision Repair » ou BER). Leur intervention peut cependant faire défaut, et donner lieu pendant la réplication de l'ADN à une cassure des deux brins.

Comme il a été mentionné plus haut, les chaînes d'ADN ne doivent être modifiées qu'au minimum, pour assurer la conservation de la mémoire génétique. Cependant, il existe aussi des occasions où des déplacements, mélanges, remplacements de séquences sont nécessaires à certains processus biologiques, notamment de reproduction et d'immunité.

i. Recombinaison des chromosomes homologues durant la méiose :

La diversité génétique des individus est une question de survie pour toute espèce. L'évolution a doté la reproduction sexuée d'un mécanisme d'échange de gènes qui se déroule durant la méiose et assure que chaque gamète possède un génome unique, différent de celui de son (sa) géniteur(trice). Suite à la réplication de l'ADN en début de méiose, les chromosomes homologues s'alignent et se collent par l'action du complexe synaptonémale. La proximité des loci homologues facilite la mise en place de jonctions « Holliday » (voir paragraphe III.b.ii.2) et la recombinaison de ces séquences. La chaîne d'ADN doit pour cela être ouverte par une topoisomérase, Spo1, accompagnée de facteurs spécifiques ou non de la méiose. Les brins séparés sont reliés aux brins homologues par les facteurs de réparation qui interviennent aussi en cas d'ouverture imprévue. Cette recombinaison méiotique est d'autant plus cruciale pour la gamétogénèse qu'un nombre suffisant d'échanges doivent se faire pour autoriser la ségrégation des chromosomes et la suite du processus (Richardson et al., 2004).

ii. Variabilité des gènes d'immunoglobuline :

L'une des forces des systèmes immunitaires des vertébrés est sa capacité à produire un anticorps spécifique de chaque antigène. La diversité des anticorps est produite au niveau génétique, lorsque des séquences codantes d'immunoglobulines sont formées à la demande, par recombinaison. Elles sont uniques, et résultent de l'assemblage selon un schéma commun de « pièces détachées », les segments V (variable), D (diversité), et J (jointure). Dans une cellule lymphocyte, ces segments vicinaux doivent être choisis, excisés et reliés les uns aux autres pour permettre la fabrication d'un nouvel anticorps. La machinerie enzymatique de cette recombinaison, dite V(D)J, a beaucoup de facteurs en commun avec celle de réparation des cassures double brin de l'ADN (*Gellert, 2002*).

iii. Commutation du signe de conversion (type sexuel) chez la levure :

Au cours d'un cycle de reproduction, deux cellules haploïdes de signes de conversion différents fusionnent pour donner une cellule diploïde capable de sporulation. Le signe de conversion, α ou a , est déterminé par le seul locus MAT, et peut changer périodiquement dans une même cellule. Cette commutation est en réalité une excision/recombinaison de séquences codantes voisines sur le locus MAT réalisé par un système appelé lecteur de cassette. Il met en jeu la machinerie de réparation des DSB pour placer la nouvelle cassette au site actif du locus MAT.

III. Détecter et réparer les DSB

La réaction d'une cellule aux cassures double brin met en jeu plusieurs étapes, la détection, la transmission du signal, puis la réparation en elle-même ou re-ligation (**Figure 14**). Les facteurs particulièrement utiles à l'une ou l'autre sont appelés des détecteurs, des transmetteurs, et des effecteurs. Cependant, il n'est pas aisé de restreindre la fonction d'un facteur dit « de réparation » à l'un de ces groupes. Ainsi, le complexe MRN a été considéré depuis sa découverte comme un effecteur, du fait de ses activités enzymatiques primordiales pour la réparation (voir paragraphe III.c.i.1). Néanmoins, l'une de ses sous-unités, Nbs1, est recrutée très tôt sur le site de réparation, et interagit avec ATM, kinase de signalisation. Le complexe pourrait donc tout aussi bien être considéré comme un détecteur, ou un transmetteur (*Petrini et Stracker, 2003*).

a. Détection

Avant de pouvoir être réparée, une cassure double brin de l'ADN doit être détectée, et l'information transmise par le biais de cascade de signalisation. C'est aujourd'hui encore une des étapes les plus obscures de la réponse cellulaire aux DSB. Certains facteurs ont pu être qualifiés de « détecteurs », mais le mode de détection et de transmission de l'information n'est que très mal compris. Un des événements les plus facilement détectables est la phosphorylation de l'histone H2AX, noté alors γ H2AX (*Rogakou et al., 1998*). Elle intervient sur la Serine 139, à la suite d'un DSB, et couvre en quelques minutes, une portion de plusieurs Mégabases autour du site endommagé. Il a été démontré chez la souris que la forme phosphorylée de H2AX est nécessaire au bon déroulement des deux principaux processus de réparation, HR (Recombinaison Homologue) et NHEJ (« Non Homologous End Joining ») détaillés ci

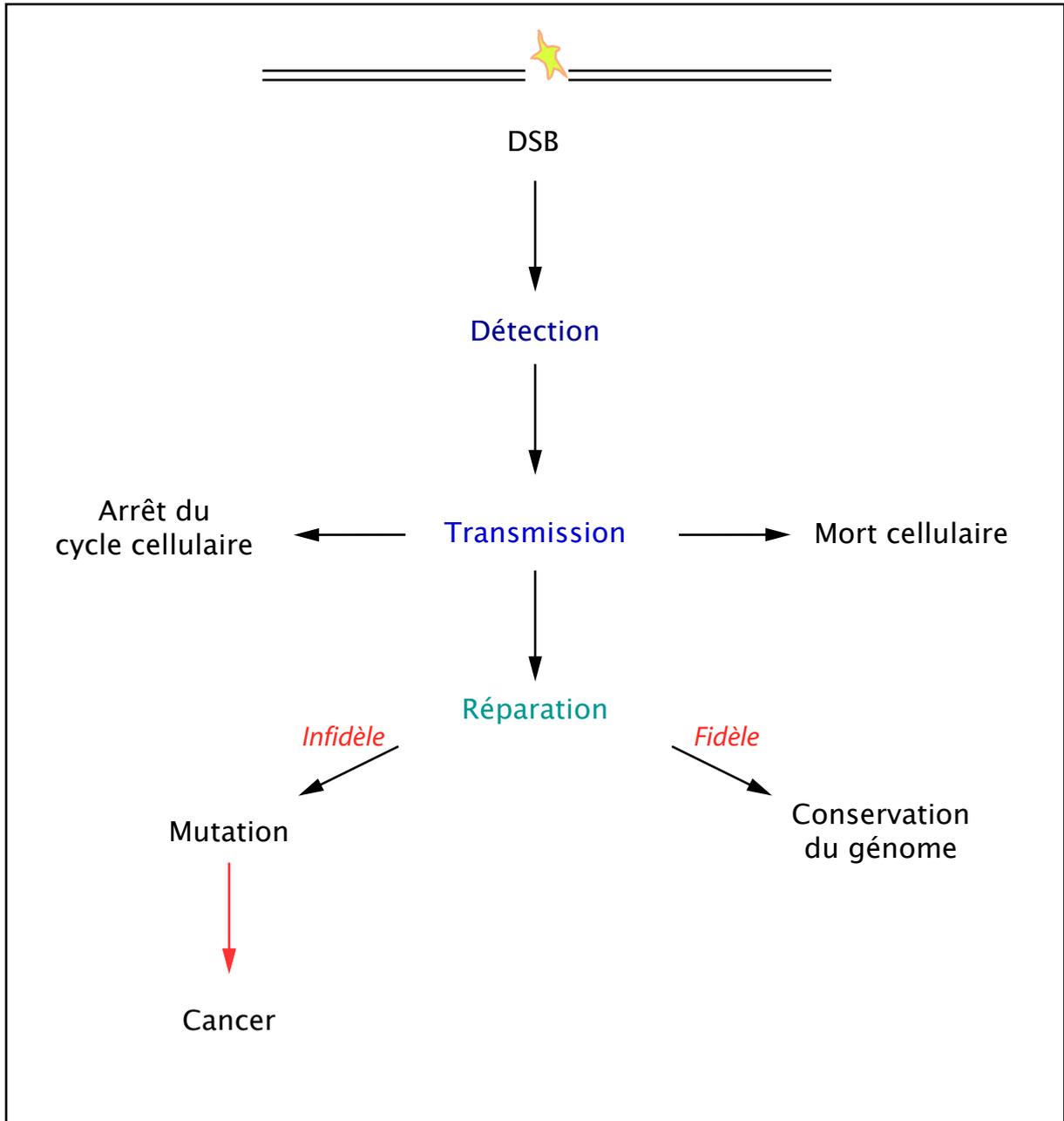


Figure 14 : **La réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN.**

La présence d'une cassure dans le génome va induire une succession d'événements. Certains facteurs détectent la cassure, puis une étape de transmission du signal permet de décider de l'avenir de la cellule : ralentir le cycle cellulaire pour réparer, ou se suicider ? Dans le même temps, la machinerie de réparation est activée. Elle peut restorer la double hélice sans perte d'information, ou introduire des mutations qui débouche dans certains cas sur la transformation tumorale de la cellule.

dessous (*Fernandez-Capetillo et al., 2004*). Elle facilite en effet le recrutement de nombreux facteurs de réparation de l'ADN (*Paull et al., 2000*). La délétion d'H2AX ou son remplacement par une forme non phosphorylable est néfaste à l'organisation massive de facteurs de réparation qui forment les IRIF (IRradiation Induced Foci) (*Celeste et al., 2003*).

Cependant, la modification d'H2AX n'est probablement pas le premier événement de détection, puisque dans le cas où H2AX est déficient, un recrutement de facteurs de réparation, différent des IRIF, est observé (*Celeste et al., 2003 ; Petrini et Stracker, 2003*). ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et ATR (*ATM and Rad3 related protein*), deux kinases de la famille PIKK (décrite au paragraphe IV.a.i.2 de ce chapitre), pourraient assurer la détection des DSB. Elles sont en effet à l'origine de la phosphorylation d'H2AX, mais leur recrutement direct sur le site de cassure n'est pas avéré. Leur activation dépend donc aussi d'un « détecteur » direct.

Quelques indications sont apparues récemment à l'étude de Mec1p, l'homologue chez *S. cerevisiae* d'ATR, et du facteur ATRIP (ATR Interacting Protein). Le recrutement sur un ADN linéaire de Mec1p dépend de son substrat Lcd1p, mais l'inverse n'est pas vrai (*Rouse et Jackson, 2002*) ce qui place Lcd1p en amont dans une cascade d'activation. La délétion de ce dernier inhibe la phosphorylation d'autres substrats des PIKK comme Chk1. Par ailleurs, ATRIP est l'homologue humain de Lcd1p (*Bradbury et Jackson, 2003*), et forme un complexe avec ATR (*Cortez et al., 2001*). Plus récemment, il a été montré que le recrutement d'ATR-ATRIP sur un ADN simple brin dépendait de la présence de RPA (Replication protein A). Ainsi, RPA pourrait être le facteur-clé de la détection arrivant en premier sur le site de cassure. Son appartenance à la machinerie de réplication suggère l'interdépendance de ces deux mécanismes.

Dans le cas de la réparation par liaison d'extrémités sans homologie ou « Non Homologous End Joining » (NHEJ), l'hétérodimère Ku70/ku80 (détaillé au paragraphe III.b.i) semble répondre aux critères de détecteur : il se lie très rapidement aux extrémités endommagées puis permet le recrutement de la sous-unité catalytique DNA-PK qui elle-même phosphoryle la ligase IV et la rend active (*Smith et Jackson, 1999*). Cependant, le mécanisme décrit ci-dessus semble s'appliquer indépendamment du chemin de re-ligation employé.

b. Réparation

i. Organisation spatiale de la réparation

L'utilisation de l'imagerie microscopique et d'outils immunologiques ont permis une observation précise de la réaction cellulaire aux DSB. L'apparition d'une cassure dans le noyau déclenche le rassemblement de facteurs de réparation en un foyer facilement observable en microscopie combinée à l'immunodétection de γ H2AX. À l'instar de la machinerie de réparation, qui semble amener plusieurs origines de

réplication dans un centre fixe où les facteurs de réplication sont organisés (*Hozak et Cook, 1994*), les sites endommagés sont regroupés en larges « cluster » (*Lisby et al., 2003*). Ces foyers ont été largement étudiés, et regroupent à la fois des enzymes de réparation et des facteurs de signalisation (le complexe MRN, RPA, Rad17, BRCA1, ATR...). Ils sont le siège des mécanismes de réparation. En effet, l'incorporation de BrdU dans ces foyers dénote la polymérisation de nucléotides, qui intervient au cours de la recombinaison homologue (HR) (*Haaf et al., 1999*), tandis que la présence de la forme phosphorylée de la DNA-PKcs montre que le NHEJ intervient également (*Chan et al., 2002*).

Notons enfin que les foyers de réparation ne sont pas des structures statiques, car les facteurs recrutés semblent avoir un comportement très dynamique en échange constant avec le reste de l'environnement nucléaire. Ceci suggère une dépendance importante et une communication nécessaire avec les autres processus cellulaires (réplication, transcription, cycle cellulaire). Leur résorption est aussi un événement régulé, qui intervient en fonction de la complexité de la cassure et du stade du cycle cellulaire (*Lisby et Rothstein, 2004*).

ii. Les différents mécanismes de réparation des DSB

Plusieurs mécanismes conservés chez tous les eucaryotes permettent à une cellule de relier les brins d'ADN séparés :

- la recombinaison homologue (Homologous Recombination, HR), qui reconstitue le site endommagé par homologie avec un ADN identique présent, donc le plus souvent après réplication du génome en phase G2, ou dans une cellule diploïde.
- La liaison de bouts sans homologie ou « Non homologous end joining » (NHEJ), qui, par un mécanisme plus simple, retravaille les bouts endommagés et les relie avec plus ou moins de pertes d'information génétique.
- « L'annélation » de simple brin (SSA) enfin, qui est un mécanisme intermédiaire s'appuyant sur une zone de cohésion de quelques paires de bases entre les brins à lier, pour religuer de la même façon que le NHEJ.

Le NHEJ prédomine chez les mammifères, contrairement aux eucaryotes moins évolués, ce qui n'empêche pas la recombinaison homologue (HR) d'avoir des implications spécifiques dans la signalisation et la régulation de l'activité cellulaire, qui la rendent indispensable à la vie de la cellule. Pour simplifier, la prédominance d'un mécanisme sur l'autre est aussi dépendante de l'étape du cycle cellulaire, de la nature de la cassure, ce qui en fait un sujet encore très débattu (*Valerie et Povirk, 2003*).

1. NHEJ

Le mécanisme NHEJ est plus sujet aux erreurs que la recombinaison homologue, mais n'est pas aussi exigeant sur les conditions et les acteurs présents. Il est particulièrement connu pour résoudre les cassures donnant lieu à des extrémités complexes, et sans homologie pour faciliter l'appariement des brins.

La réparation par NHEJ d'un DSB se déroule en plusieurs étapes (**Figure 15**) : la préparation des extrémités endommagées, la création d'un pont moléculaire, entre les brins pour faciliter la ligation, et enfin le remplissage des bases manquantes, et la ligation.

Des endonucléases spécialisées éliminent tout d'abord les bases endommagées par la cassure. Par exemple, Tdp1 et APE1 découpent des fragments de riboses laissés aux extrémités 3' (*Inamdar et al., 2002 ; Suh et al., 1997*). Il semble qu'une large gamme d'enzymes intervienne pour nettoyer les modifications chimiques qui empêcheraient la re-ligation.

Après cela, les facteurs centraux du NHEJ sont recrutés. Ils ont été plus étudiés, et mieux

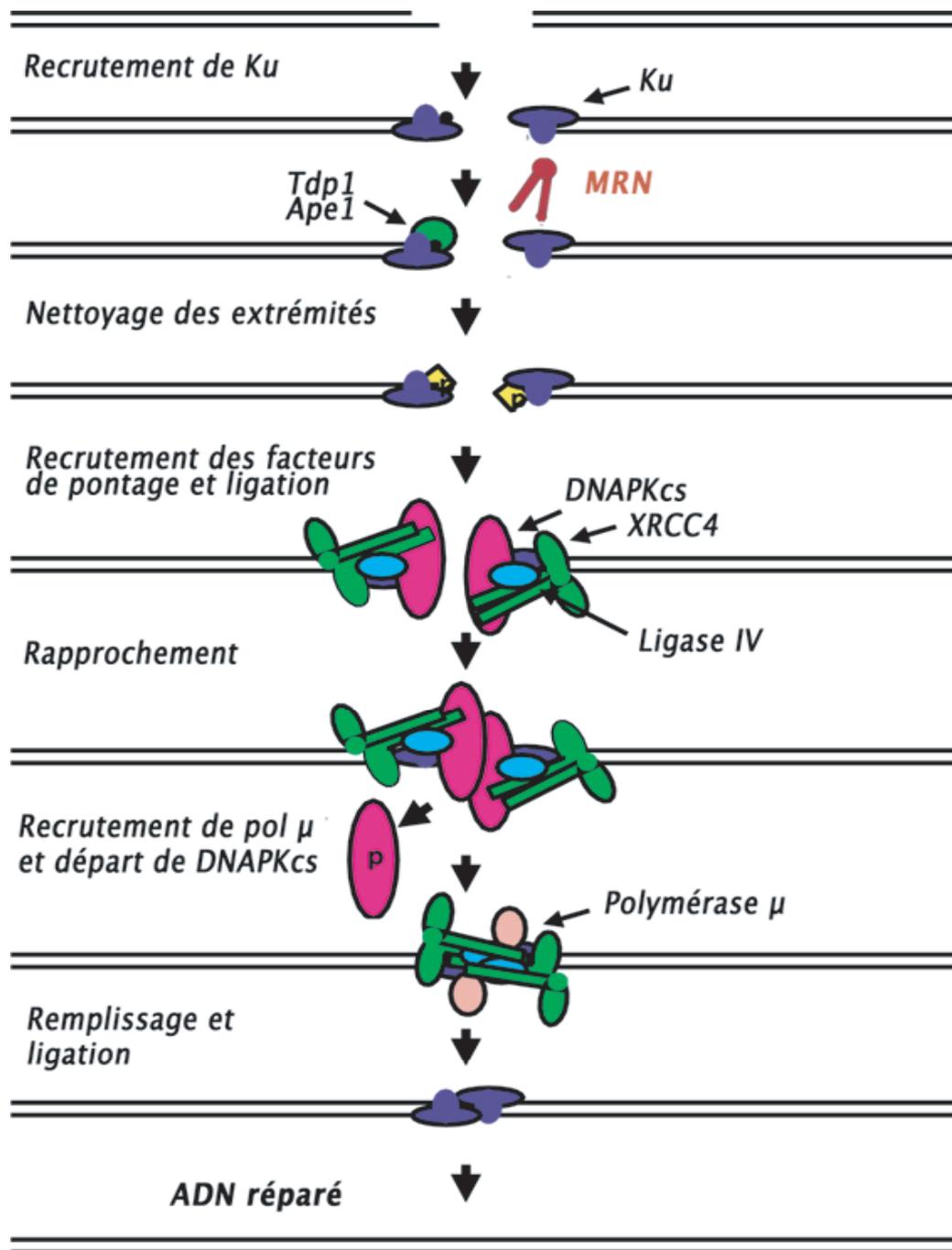


Figure 15 : Modélisation du processus de réparation par "Non Homologous End Joining". Les différentes étapes et facteurs de réparation sont représentés. Le complexe MRN est indiqué sans positionnement précis car celui-ci n'est pas déterminé in vivo. Le carré jaune à l'étape 4 représente l'extrémité d'ADN préparé à être reliée.

caractérisés que les précédents. D'une part, l'hétérodimère Ku70/Ku80, associé à la DNA-PKcs, assure le rapprochement des deux brins d'ADN à lier. Il sert aussi de plateforme d'interaction pour la ligase IV, dont le recrutement est strictement dépendant de son partenaire XRCC4 (Bryans *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2000). La coopération de KU/DNAPKcs et XRCC4/LigIV dans le rapprochement des extrémités d'ADN n'est pas clairement définie (Valerie *et Povirk*, 2003). Mais, on soupçonne la formation d'un pont par deux hétérodimères KU/DNAPKcs ce qui stabiliserait la liaison de XRCC4/LigIV sur les bouts d'ADN.

Le processus NHEJ entraîne la perte de bases qu'il faut remplacer sur chacun des brins, et des polymérases d'ADN spécifiques interviennent pour cela. La meilleure candidate à ce jour est la polymérase μ , car elle s'associe spécifiquement au complexe XRCC4/LigIV sur l'ADN (Mahajan *et al.*, 2002). Cependant, son action n'a pas été confirmée *in vivo*.

D'autres facteurs de réparation, comme la PNKP, BRCA1, WRN, Artemis, sont aussi des acteurs potentiels du NHEJ pour diverses raisons. MRN en fait probablement partie : Mre11, comme Artemis et WRN, est une exonuclease 3'-5', dont l'activité catalytique pourrait être utile au « nettoyage » des bases endommagées sur le site de cassure avant ligation. Le complexe dans son ensemble est capable de retirer quelques bases pour dégager une extrémité simple brin et créer une courte zone d'appariement (Paull *et Gellert*, 1998). Enfin, l'activité hélicase d'Artemis et MRE11 est aussi impliquée, même si ces détails mécanistiques ne sont pas encore élucidés. Tous les deux pourraient intervenir en aval d'ATM dans la réparation de DSB complexes. Ceci est suggéré par l'observation de cellules déficientes pour ATM, Mre11, Nbs1 ou Artemis : toutes réparent une majorité de cassures dans un temps raisonnable, mais ne peuvent résoudre notamment des cassures complexes introduites par des particules alpha (Riballo *et al.*, 2004).

Par ailleurs, deux mécanismes de NHEJ pourraient exister (Udayakumar *et al.*, 2003). Ils se différencieraient par les facteurs impliqués, mais conserveraient la même étape de ligation par la Ligase IV. Le premier serait indépendant de la DNAPKcs, ce qui est en accord avec les travaux de Huang *et al.* (Huang *et Dynan*, 2002). Ils montrent en effet dans un système reconstitué étape par étape, que l'ajout de certains facteurs (Ku70, MRN, Ligase IV) rend la DNAPKcs de moins en moins indispensable. Elle pourrait avoir pour rôle de protéger le brin cassé, mais ne serait pas indispensable à la ligation. Dans le second mécanisme, cette kinase PIKK serait requise, mais les conditions qui différencient ces deux types de NHEJ ne sont pas connus.

2. HR

La recombinaison homologue permet une réparation très fidèle de l'ADN car elle requiert la présence d'une séquence homologue à la séquence endommagée. La séquence saine sert de modèle et aucune base n'est perdue ou échangée,

contrairement au NHEJ. Du fait de ce besoin d'un modèle, la recombinaison homologue semble être une voie de réparation minoritaire qui intervient en fin de phase S ou G2, et dans des cellules spécifiquement diploïdes. Elle s'appuie sur la formation de jonctions entre chromatides sœurs par le complexe de cohésion des chromosomes. En effet, il a été observé que la protéine responsable de cette cohésion, la Cohésine, est présente sur une large zone autour d'un DSB *in vitro* (Unal et al., 2004). Cependant, si ce mécanisme génère peu d'erreur, il débouche parfois sur des réarrangements de chromosome ou des pertes d'hétérozygotie.

Un certain nombre de facteurs de réparation semblent plus particulièrement liés à la recombinaison homologue : RAD51, RAD52, RAD54, RAD51b qui font partie du même groupe d'épistasie, mais aussi BRCA1 et BRCA2, XRCC2, XRCC3 et le complexe MRN (Thompson et Schild, 2001).

Les brins d'ADN endommagés sont d'abord déroulés et recoupsés, probablement par le complexe MRN aidé d'autres facteurs (Figure 16). L'activité ATPase de Rad50 serait particulièrement impliquée dans l'ouverture de la double hélice (Paull et Gellert, 1999). Puis, Rad51 favoriserait l'entremêlement des brins modèle et les brins à réparer en se liant aux extrémités d'ADN. Rad52, qui forme un anneau polymérique entourant ADN simple brin et double brin, participe aussi à cette étape. L'ADN modèle et les extrémités à relier sont alors mélangés de telle façon que chaque simple brin est en interaction avec une partie de l'hélice homologue. Cette situation est qualifiée de jonction Holliday. La fidélité de la réparation est assurée par ce croisement des brins. La jonction Holliday peut déboucher sur un croisement des brins ou non, selon qu'elle se sépare avant ou après que les extrémités consécutives aient été rattachées (Valerie et Povirk, 2003) (Figure 16). Le premier cas, où l'hélice saine se sépare avant que tous les nucléotides manquants aient été ajoutés par une ADN polymérase, est le plus courant. Dans le second, des endonucléases coupent les brins en position croisée, et les polymérases et ligases comblent les manques en introduisant un « crossing over ». Ce type de résolution des jonctions Holliday permet des échanges d'allèles, dans un autre contexte (recombinaison méiotique). Les facteurs et mécanismes qui orientent ce choix sont aujourd'hui encore inconnus (Johnson et Jasin, 2000).

3. SSA

La réparation par « annelation » de bouts d'ADN simple brin (Single Strand Annealing) possède des caractéristiques communes aux deux processus décrits ci-dessus. Comme le NHEJ, elle ne s'appuie pas sur une double hélice saine et homologue pour réparer avec fidélité. En revanche, le SAA va rechercher sur la séquence endommagée une portion homologue de chaque côté, pour restaurer la cohésion des deux extrémités. Et comme la recombinaison homologue, il crée de larges délétions sur chacun des brins cassés avant d'engager la réparation, afin de rechercher une portion d'ADN homologue.

Le SSA utilise donc des protéines également actives dans les deux processus décrits ci-dessus : le complexe MRN tout d'abord recoupe un brin de chaque côté de la cassure jusqu'à mettre à nu aux deux extrémités des séquences répétées qui vont pouvoir se ré-hybridiser (Figure 17). Il va ensuite y avoir une hybridation des homologies exposées, l'élimination des parties dépassants de chaque côté, et enfin la religation des deux brins. Selon la longueur des parties recoupées et celle de l'homologie, certains auteurs distinguent une « annelation » par micro-homologie d'une « annelation » par longue homologie, la première se rapprochant plus du NHEJ. Cette distinction reste floue et les acteurs et étapes des deux processus sont mal connus. L'intervention de

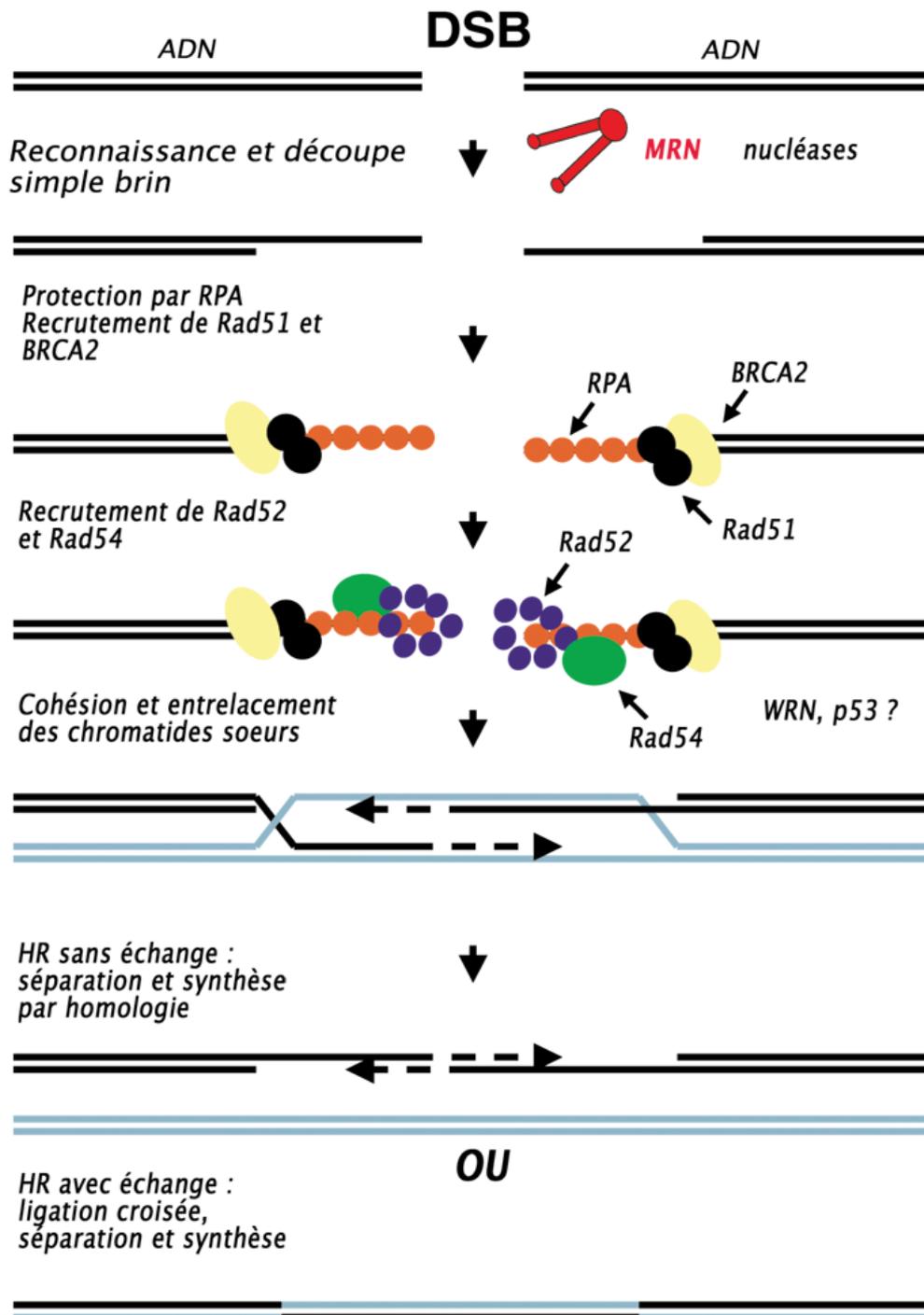


Figure 16 : **Modélisation du processus de réparation par recombinaison homologue.** Les différentes étapes et facteurs de réparation sont représentés par des symboles, à l'exception des nucléases, et de WRN et p53 dont le rôle n'est pas sûr. La dernière étape peut suivre deux chemins, une séparation des chromatides avant le remplissage des bases manquantes et la ligation, ou la ligation croisée puis la séparation, ce qui conduit à un échange.

Ku70/Ku80, associé à l'hélicase WRN, de l'ADN ligase I, et de la DNase III sont suggérées pour l'annélation par micro-homologie (*Valerie et Povirk, 2003*). En cas de longue homologie, la protéine RAD52 assumerait le rôle de RAD51 dans la HR en se liant aux extrémités homologues et favorisant leur association (*Van Dyck et al., 2001*). Les séquences non nécessaires dépassant en aval de ces domaines d'homologies sont éliminées par une endonucléase, probablement ERCC1/XPF (*Adair et al., 2000*).

Il est possible que le processus « d'annélation » de simple brin soit la conclusion rapide d'une recombinaison homologue qui ne peut aboutir. En effet, si un ADN double brin modèle fait défaut ou un facteur essentiel au processus HR, la réparation dérive vers un mécanisme plus proche du NHEJ.

c. MRN, intervenant multifonction de la réparation DSB

i. sous-unités et leurs fonctions enzymatiques :

Les domaines et motifs des 3 sous-unités du complexe MRN sont représentés dans la **Figure 18**.

1. MRE11

MRE11 est une protéine d'environ 75 KD, très conservée puisque des homologues existent depuis *Pyrococcus furiosus* et *E. coli* jusqu'à l'homme (*Connelly et Leach, 2002*). Elle est caractérisée dans sa partie amino-terminale par 4 motifs phosphoestérase, qui forment un domaine nucléase activé par le manganèse. Sa partie carboxy-terminale présente aussi un site de liaison à l'ADN. Mre11 est exceptionnellement pourvue en activités enzymatiques liées au travail de l'ADN (résumée dans (*D'Amours et Jackson, 2002*)). Elle découpe des nucléotides dans le sens 3'→5' (ds exonucléase), mais avec une plus grande efficacité sur les duplex protubérants en 5' ou droits, que sur ceux protubérants en 3' (*Paull et Gellert, 1998 ; Trujillo et al., 1998*). L'enzyme ouvre aussi les boucles en épingle à cheveux (hairpin opening), grâce à une activité endonucléase plus faible. Ces dernières capacités nécessitent de l'ATP, ce pour quoi Mre11 est dépendante de Rad50. Indépendamment de la présence d'ATP, Mre11 détecte aussi les micro-homologies entre deux brins à relier. Ceci laisse supposer qu'elle pourrait recouper *in vivo* les extrémités inégales pour permettre à une ligase de réparer des brins complémentaires.

De même que Nbs1, Mre11 est phosphorylé par les kinases ATM ou ATR, en réponse à l'induction de DSB. Notons que la présence de Nbs1 est nécessaire à cette phosphorylation (*Dong et al., 1999*).

Deux mutations ponctuelles de Mre11, dont une au sein du domaine nucléase, sont caractéristiques du syndrome *Ataxia Telangiectasia Like* (ATLD), similaire à la maladie génétique due aux mutations de la kinase ATM (*Stewart et al., 1999*). Ces mutations sont très probablement hypomorphiques, car une délétion totale de Mre11 chez la souris est létale au stade embryonnaire (*Xiao et Weaver, 1997*).

2. RAD50

Le gène humain *rad50* appartient au groupe d'épistasie de RAD52, dont les membres participent, chez la levure, aux principales voies de réparation des cassures

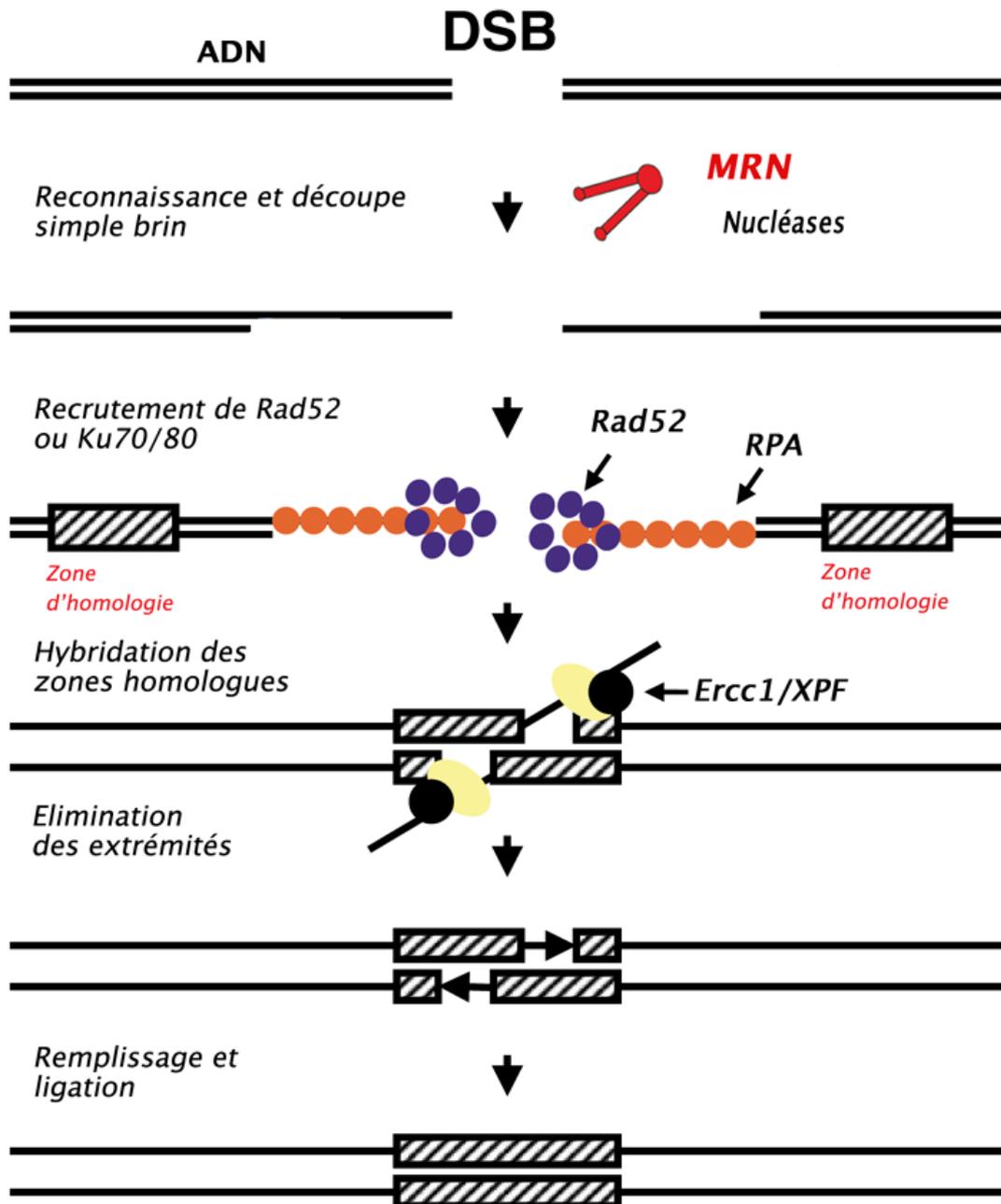


Figure 17 : **Modélisation du processus de réparation par annellation de simple brin (SSA)** : Les différentes étapes et facteurs de réparations sont représentés. Les zones rectangulaires grisés sur l'ADN figurent des fragments répétitifs ou zones homologues, qui servent à hybrider les brins séparés dans ce processus.

double brin. Notons de plus que *rad50* se situe sur le chromosome 5, dans une zone connue pour être fréquemment altérée chez les individus souffrant de leucémie myéloïde aiguë (*Le Beau et al., 1993*).

D'un poids moléculaire d'environ 150 kD, la protéine Rad50 est pourvue de domaines Walker A et B répartis aux deux extrémités (**Figure 18**). Ils sont séparés par deux séries répétées heptamériques, formant deux long bras super-enroulés. On suppose que la protéine peut se replier en épingle à cheveux pour rapprocher les domaines Walker qui forment un site de reconnaissance des nucléotides. Ce site catalytique est le lieu d'hydrolyse de l'ATP, mais aussi de liaison à l'ADN. Le coude entre les deux bras, quant à lui, possède la capacité d'interagir avec d'autres protéines par un motif CXXC, qualifié de « crochet de zinc ». En effet, deux motifs similaires s'organisent pour complexer un ion Zn^{2+} entre 4 cystéines. Cette région autoriserait la dimérisation de RAD50 au sien du complexe MRN. D'autre part, la structure de RAD50 est caractéristique de la famille des SMC (Structural Maintenance of Chromosome, maintenance structurale des chromosomes), des facteurs essentiels à la structure condensée des chromosomes (*D'Amours et Jackson, 2002*).

L'activité ATPase de Rad50 sert de force motrice au complexe MRN. Mais, elle est soumise à une régulation par Nbs1, comme les activités enzymatiques de Mre11. Pour preuve de cela, la présence d'ATP n'a aucun effet sur l'activité *in vitro* d'un complexe recombinant hSMR, dépourvu de Nbs1 (*Paull et Gellert, 1999*).

Enfin, Rad50 est essentiel au développement embryonnaire chez la souris tout comme Mre11 (*Luo et al., 1999*). On notera cependant que le KO de *scrad50* n'a pas un effet aussi drastique : une telle souche de levure est capable de relier des brins d'ADN par recombinaison (*Malone et al., 1990*). Un mécanisme de recombinaison actif et finement régulé est donc plus particulièrement essentiel à la survie d'organismes pluricellulaires.

3. NBS1

Nbs1 ne fut identifié comme partenaire de Rad50 et Mre11 que tardivement, car sa séquence, à la différence des deux autres, a beaucoup changé au cours de l'évolution : elle n'est que très peu homologue à la protéine de levure Xrs2, qui s'associe à *scMre11* et *scRad50* (*Carney et al., 1998*), et ne semble pas avoir d'homologue chez les procaryotes. Le gène *nbs1* était connu auparavant pour être responsable du Syndrome de Cassure Nijmegen (Nijmegen Breakage Syndrome) s'il était muté (mutation hypomorphique) (*Maser et al., 2001*). Par ailleurs, une délétion homozygote du gène *nbs1* chez la souris est létale au stade embryonnaire (*Zhu et al., 2001*).

Aujourd'hui encore, la fonction de Nbs1 au sein de MRN semble assez floue. Elle est un peu éclairée par la présence d'un domaine « forkhead-associated » FHA en amino-terminale (**Figure 18**). Il s'agit d'un domaine d'interaction avec d'autres protéines, dépendant de la présence d'une phosphorylation. Nbs1 est une cible pour la kinase ATM, dans la cascade d'événements qui suivent l'induction de DSB. ATM phosphoryle la Sérine 343 de Nbs1 (*Lim et al., 2000*), et régule ainsi son activité. Celle-ci doit pouvoir interagir avec certains partenaires en réponse à son activation par ATM. De plus, Nbs1 possède à la suite du domaine FHA un domaine homologue à la partie amino-terminale de BRCA1 (Breast cancer associated protein 1), nommé BRCT, qui est également impliqué dans des interactions protéine-protéine. H2AX phosphorylé pourrait être un de ses partenaires, car il a été observé en interaction avec le domaine FHA/BRCT de Nbs1 (*Kobayashi, 2004*). De façon concordante, la mutation du motif FHA ne cause pas d'hypersensibilité aux irradiations, mais bloque le recrutement de MRN aux sites de

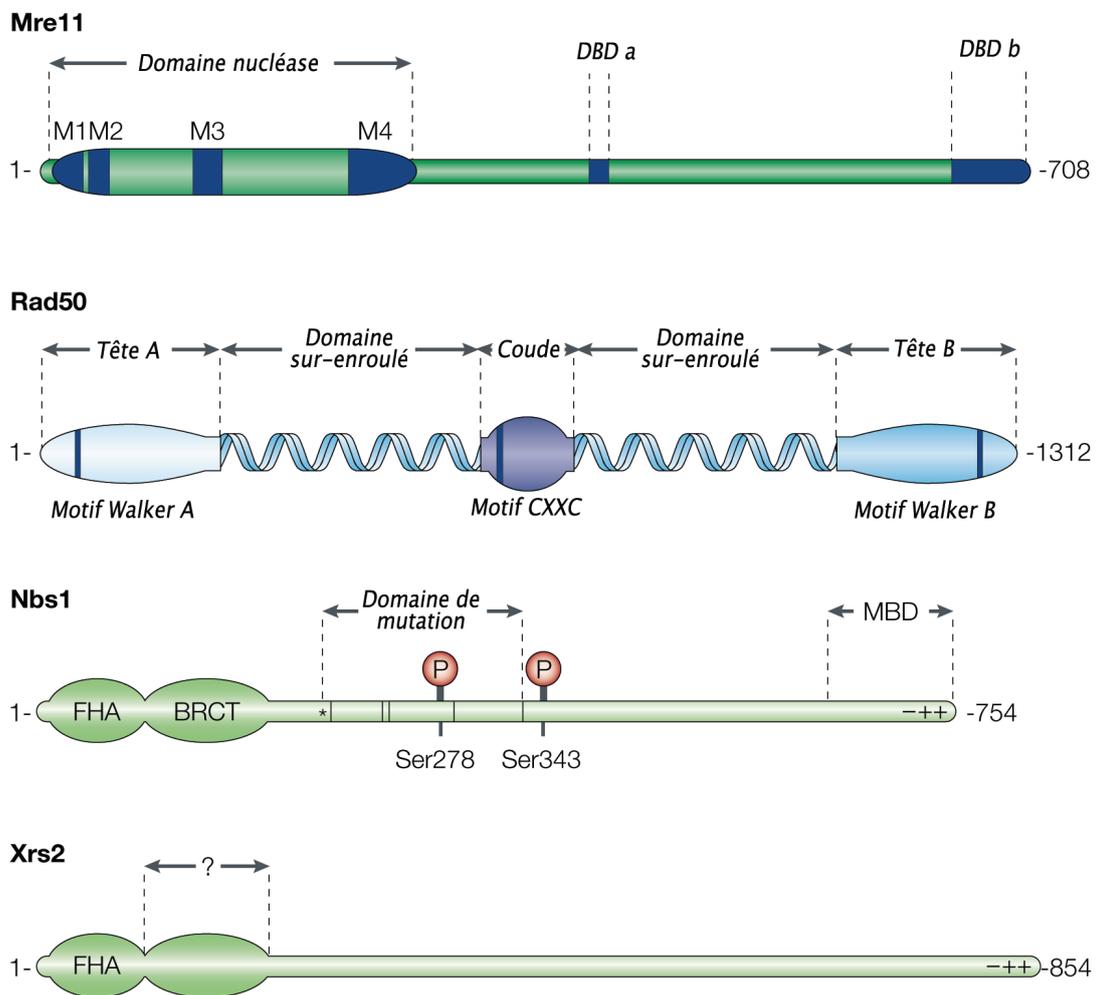


Figure 18 : Organisation des séquences de Mre11, Rad50, Nbs1 et Xrs2.

Les portions M1 à M4 du domaine nucléase de Mre11 symbolisent les motifs phosphoestérases conservés. DBDa et b sont les domaines d'interaction avec l'ADN. Le schéma de Rad50 montre les deux motifs Walker qui forment le site ATPases, et au centre des séquences superenroulées, le coude d'interaction avec d'autres facteurs. Les cercles rouges sur la séquence de Nbs1 correspondent aux sites de phosphorylation. FHA : Forkhead associated domain. BRCT : domaine carboxy-terminal de BRCA1. MBD : domaine d'interaction avec Mre11 (Adapté de (D'amours D, 2002)).

cassures. Ce domaine est donc plus particulièrement impliqué dans la signalisation des DSB que dans leur re-ligation (Tauchi *et al.*, 2001). Par extension, on peut supposer que Nbs1 soit une sous-unité de signalisation, tandis que Mre11 et Rad50 assurent les fonctions de réparation. Ceci est confirmé par l'observation que Nbs1 n'est pas indispensable au NHEJ *in vitro* (Tauchi *et al.*, 2002).

Si l'on est certain que Mre11 et Rad50 sont présents en deux copies dans MRN, rien n'est sûr pour Nbs1 : certains supposent qu'elle est présente en un unique exemplaire qui se lierait à un dimère de Mre11 (Chen *et al.*, 2001a ; D'Amours et Jackson, 2002 ; Paull et Gellert, 1999), ce qui expliquerait la sous-stoechiométrie observée *in vitro*. D'autres se basent sur une représentation égale des trois partenaires dans le complexe (Lee *et al.*, 2003). Cependant, la première possibilité semble plus proche de la réalité, dans la mesure où le complexe recombinant de levure est constitué de 2 Mre11, 2 Rad50 pour 1 Xrs2 (Chen *et al.*, 2001a).

Notons enfin que les activités respectives de Mre11 et Rad50 sont nettement favorisées par la présence de Nbs1 (Lee *et al.*, 2003 ; Paull et Gellert, 1999). La phosphorylation de Nbs1 par ATM régule la phosphorylation de Mre11, et la conséquence de ces modifications est l'activation du complexe. Cette troisième sous-unité peut donc être considérée comme le « commutateur » du complexe MRN, régulant son activité en réponse aux signaux des facteurs de signalisation. Nbs1 une fois recrutée sur les sites de cassures et phosphorylée par ATM n'est pas statique mais diffuse dans le voisinage immédiat, ce qui concorde avec un rôle d'intermédiaire entre « transmetteurs » et « effecteurs ».

ii. Structure du complexe

Les élégantes observations en microscopie de force atomique de de Jager *et al.* (de Jager *et al.*, 2001) montrent Mre11/Rad50 sous une forme bipolaire, soit une partie globulaire (tête) attachée à deux long bras qui sont les segments centraux superenroulés de Rad50 (Figure 19). Cette structure « tête et bras » est retrouvée dans les observations par microscopie électronique de l'hétérotétramère (Mre11)₂(Rad50)₂ (Anderson *et al.*, 2001 ; Hopfner *et al.*, 2001). La tête regroupe les sites enzymatiques ATPases et nucléases, le domaine de liaison à l'ADN, et inclut probablement Nbs1. Les trois facteurs participent probablement à l'organisation de la surface de contact avec l'ADN, puisque tous trois ont des domaines de liaisons aux nucléotides. De façon concordante, l'interaction de cette partie globulaire avec l'ADN a été observée *in vitro* (de Jager *et al.*, 2001). D'autre part, les bras superenroulés de Rad50 se reconnaissent entre eux par les motifs crochets à leurs extrémités, au sein d'un même complexe ou entre différents complexes. Cette observation conforte l'hypothèse selon laquelle MRN formerait des ponts entre différents brins d'ADN (Hopfner *et al.*, 2002) (Figure 20).

De larges structures ADN-enzyme, où un grand nombre de complexes sont présents (comme celles observées *in vitro* (de Jager *et al.*, 2001)) existeraient *in vivo* permettant à la fois de protéger la lésion, de chercher une séquence homologue, et de ressouder les brins. Ceci conforte l'observation de Paull *et al.*, selon laquelle un complexe recombinant MR atteint une masse moléculaire entre 1300 et 1600 kD (Paull et Gellert, 1998). D'autres conformations sont cependant possibles (Figure 20) : par exemple, deux complexes MRN forment une boucle entre deux brins d'ADN qui doivent rester physiquement proches pour être re-liés (Assenmacher et Hopfner, 2004), ou deux chromatides dont l'une sert de modèle à la réparation de l'autre.

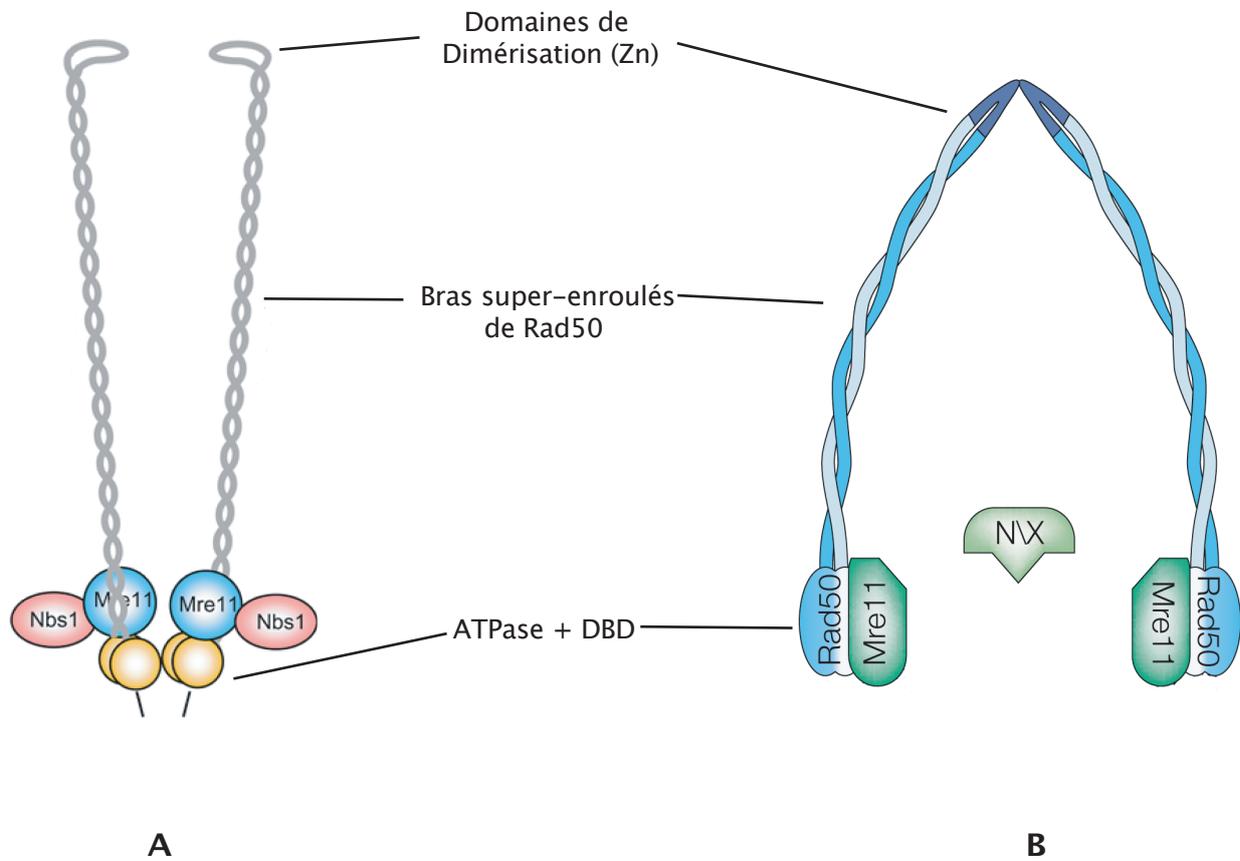


Figure 19 : **Deux modèles de l'organisation stucturale du complexe MRN**

Les domaines de dimérisation "Zinc hook" de Rad50 sont représentés en haut des deux schémas. La partie globulaire en bas contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine ATPase de Rad50. En B, Nbs/(Xrs2 est supposé permettre le maintien de la partie globulaire. A (adapté de (Assenmacher, 2004)). B (adapté de (D'amours D, 2002)).

iii. Quels rôles pour MRN dans le processus de DSB ?

MRN participe à la maintenance de l'intégrité du génome, par une action à la fois structurale et enzymatique. Ces caractéristiques enzymatiques ont pour point commun de servir la détection et la réparation des cassures double brin de l'ADN, et par conséquent, sont utiles à d'autres processus cellulaires : la recombinaison méiotique des chromosomes, l'allongement des télomères, la recombinaison V(D)J des gènes d'immunoglobuline (*Connelly et Leach, 2002*). Elles inégalement sont réparties entre Mre11 et Rad50, mais n'acquièrent leur fonctionnalité maximale que dans le complexe intègre.

Pour compléter, la structure de MRN en fait un complexe capable de lier entre elles plusieurs extrémités d'ADN. Son rôle dans la maintenance des brins cassés à proximité est très probable.

Enfin, MRN en interaction avec les PIKK participe à propager le signal de cassure double brin aux points de contrôle du cycle cellulaire.

1. Détecter les cassures DSB

L'hypothèse que MRN intervienne précocement dans la détection des cassures de l'ADN est assez ancienne. Elle découle de la ressemblance phénotypique des syndromes AT et ATLD, maladies génétiques caractérisées par une grande sensibilité aux radiations ionisantes, et dues respectivement à des mutations d'ATM et Mre11 (*Shiloh, 2003 ; Stewart et al., 1999*). ATM étant un facteur central de la signalisation des DSB, Mre11 pourrait intervenir dans le même mécanisme. L'observation par immunofluorescence de la relocalisation de MRN suite à une irradiation au niveau cellulaire montre que cette détection des lésions peut se faire en l'absence d'ATM (*Mirzoeva et Petrini, 2001*).

Un ensemble important de données biochimiques montre que le complexe MRN est profondément impliqué dans la cascade de signalisation orchestrée par ATM. Il est trouvé à la fois en amont et en aval de la kinase : Nbs1 est phosphorylée par ATM suite à un DSB (*Gatei et al., 2000*), mais cette forme phosphorylée est nécessaire, par la suite, à la phosphorylation par ATM d'autres substrats tels que Chk2 (*Buscemi et al., 2001*), SMC1 (*Yazdi et al., 2002*) ou FANCD2 (*Nakanishi et al., 2002*). Une étude plus récente montre que Mre11 comme Nbs1 favorise grandement l'activité kinase d'ATM sur Chk2, contrairement à leurs formes mutées. Étonnamment, cet effet n'est pas retrouvé sur la phosphorylation par ATM de p53 (*Lee et Paull, 2004*). Pour compléter cette fonction régulatrice, la phosphorylation d'H2AX est également dépendante d'un complexe MRN actif, et le domaine carboxy-terminal de Mre11 a une place essentielle dans ce mécanisme (*Costanzo et al., 2004*). Une étude très récente vient apporter un éclairage nouveau sur la collaboration de MRN et ATM. *In vitro*, ATM devient active en présence de MRN et d'ADN simple brin (*Lee et Paull, 2005*). L'activité ATPase de RAD50 est indispensable à cette activation, ce qui suggère qu'ATM devienne opérationnelle au contact d'un fragment d'ADN simple brin mis à jour par MRN.

Dans leur ensemble, ces données tendent à prouver que le complexe MRN est un des premiers acteurs présents sur le site de lésion. Il apparaît comme détecteur des DSB, mais aussi régulateur essentiel des kinases qui diffusent l'information « cassure de l'ADN » aux autres machineries cellulaires.

2. Organiser dans l'espace la réparation des deux brins d'ADN

Dans son action purement structurale, il semble que MRN se dimérise pour rapprocher des bouts d'ADN : la tête globulaire lie l'ADN, tandis que les bras entrent en interaction avec la partie similaire d'un autre complexe, lui-même lié par la tête à un autre bout d'ADN : le pont est créé. Ceci a été observé en microscopie de champ de force atomique pour un complexe Mre11/Rad50 recombinant par de Jager et al (*de Jager et al., 2001*). De façon similaire le complexe de levure MRX reconstitué rassemble plusieurs

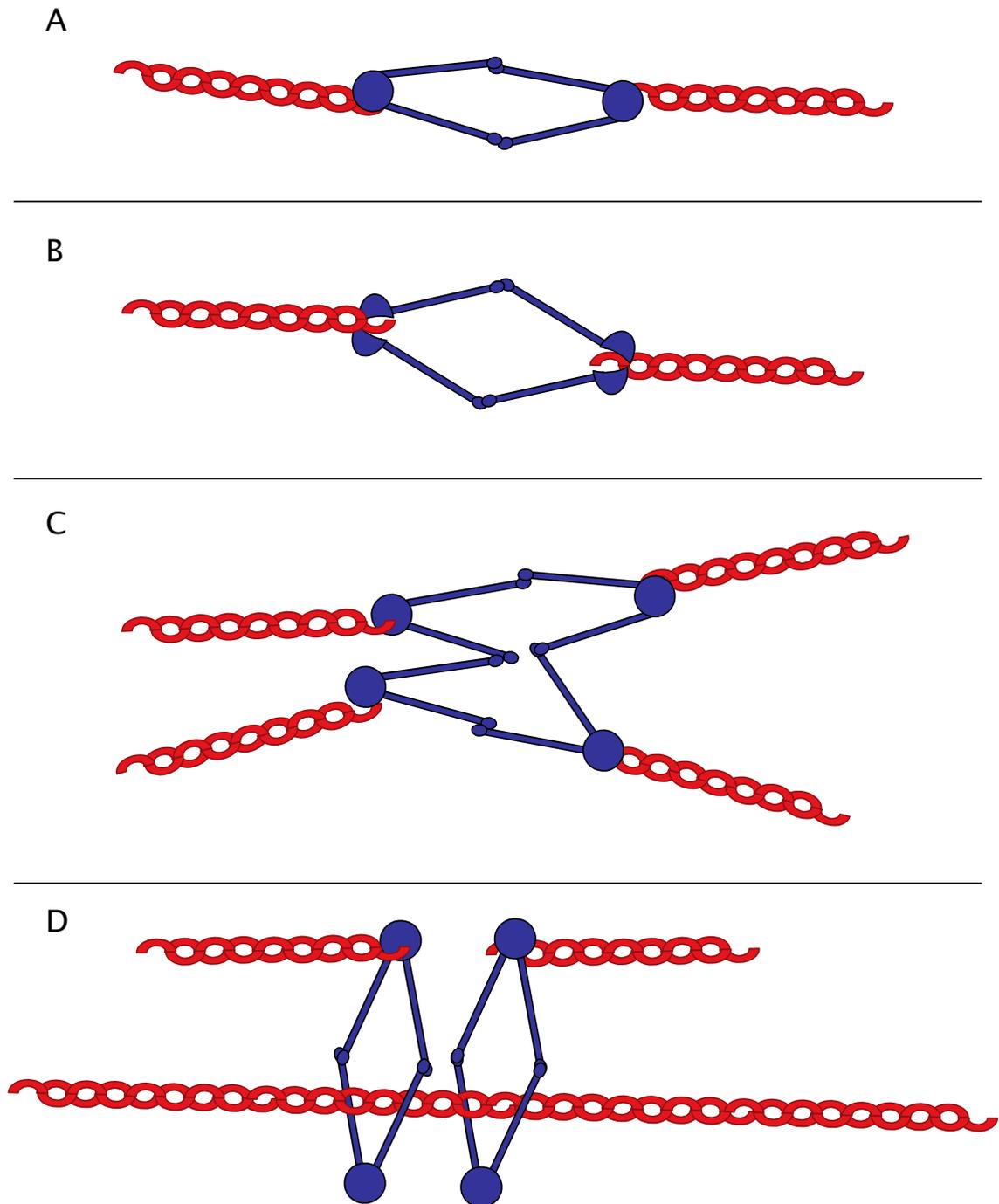


Figure 20 : **Rôle structural de MRN dans la réparation des DSB.**

MRN peut organiser des fragments d'ADN endommagés selon plusieurs modèles. A et B : ponts entre deux brins à lier. Dans le cas B, la partie globulaire se sépare en deux domaines de liaison à l'ADN. C : super-structure rassemblant les brins endommagés. D : rassemblement de brins endommagés et brins modèles.

fragments d'ADN *in vitro*, et sa présence catalyse la polymérisation de ces fragments (Chen et al., 2001a). En effet, la reconstruction de liaison par l'ADN Ligase IV/XRCC4 est inhibée en présence du complexe DNAPK (Ku70-Ku80-DNAPKcs), mais cette inhibition est levée par MRX. Un mécanisme précis de réparation doit donc impliquer ces trois partenaires : MRN, DNAPK et ligase IV. La même activité catalytique sur le NHEJ *in vitro* a été observée pour un complexe MRN humain endogène (Huang et Dynan, 2002).

Cette fonction structurale semble nécessaire aux deux processus de réparation des DSB : par recombinaison homologue quand une chromatide sœur est présente (G2, M), et par NHEJ (Connelly et Leach, 2002). Dans le premier cas, MRN pourrait être nécessaire à maintenir le fragment homologue destiné à servir de modèle pour la réparation. Il participerait à la jonction des deux chromatides avec la Cohesine (Unal et al., 2004). Dans le second cas, peu de choses sont prouvées. L'implication directe du complexe MRX de levure dans le NHEJ a été prouvée par des études biochimiques et génétiques, mais ce n'est pas le cas de son équivalent chez les eucaryotes supérieurs *in vivo* (Peterson et Cote, 2004). La nécessité physiologique de cette action de maintien a été observée *in vivo*, mais pourrait tout aussi bien être assumée par l'hétérodimère Ku70/Ku80. Cependant après irradiation, l'absence d'un complexe MRN efficace laisse de nombreux fragments de chromosomes s'éloigner de leurs fragments correspondants, et débouche sur des translocations et aberrations chromosomiques (Lobachev et al., 2004).

Plusieurs études ont montré que MRN rassemble en cas de cassures plus de deux fragments d'ADN : *in vitro*, il forme de larges structures où de nombreux fragments sont mêlés avec une grande quantité de complexes (de Jager et al., 2001). Dans un extrait d'œuf de xénope, où tous les éléments de signalisation et réparation sont présents, Mre11 est responsable de l'organisation de méga-complexes d'ADN linéaire et de facteurs de réparation (Costanzo et al., 2004). De même, le rassemblement de plusieurs sites de cassures a été observé chez la levure et implique également Mre11 (Lisby et Rothstein, 2004).

Ainsi, il est probable que le complexe MRN crée des ponts à la fois au sein d'une cassure et entre différentes cassures, pour organiser ce qu'il conviendrait d'appeler des usines de réparation.

3. Préparer les brins à lier

Au niveau moléculaire, MRN nettoie les lésions pour permettre la réparation. En effet, l'activité exonucléase 3'→5' de Mre11 est capable de débarrasser les bouts d'ADN de nucléotides endommagés (Paull et Gellert, 1998). Ceci évite qu'ils ne s'intègrent à la double hélice réparée, et créent des mutations. Dans les mécanismes de recombinaison homologue et de « single strand annealing », Mre11 est soupçonné d'ôter jusqu'à plusieurs centaines de bases à un simple brin (Trujillo et al., 1998). Mre11 seul découpe aussi les extrémités fermées en épingle à cheveux, qui sont un frein à la re-ligation (Paull et Gellert, 1999).

Rad50 par son activité ATPase stimule les activités enzymatiques de Mre11, mais le complexe n'acquiert ses capacités optimales qu'en présence de Nbs1 (D'Amours et Jackson, 2002). Le complexe ternaire MRN s'attaque en effet spécifiquement aux extrémités « bout sortant » en 3', ce qui n'est pas le cas de l'hétérodimère MR *in vitro*. De plus, l'ouverture de structures en épingle à cheveux par l'endonucléase Mre11 est largement favorisée par Nbs1.

Ainsi, un complexe MRN intègre paraît nécessaire à la préparation des extrémités endommagées avant la re-ligation.

IV. Dialogue entre la machinerie de réparation et les autres processus touchant l'ADN

a. Signalisation des DSB aux points de contrôle du cycle cellulaire

Lorsque le nombre de lésions est trop important ou les lésions trop complexes pour être réparées, la cellule doit faire un choix. D'une part, elle peut continuer le processus de réparation dans des conditions non optimales, au risque d'introduire des mutations. L'autre possibilité est d'arrêter le cycle cellulaire et d'engager un processus d'apoptose. Ce choix sous-entend une communication avec les acteurs de ces mécanismes, dans les deux cas. Les kinases de la famille PIKK semblent être les vecteurs de cette communication, car elles régulent nombre de protéines de signalisation en réponse aux lésions de l'ADN (pour une revue (*Abraham, 2004*)).

i. La famille PIKK

Ces kinases sont de grandes protéines liées par leur séquence aux kinases de 3-phosphatidylinositol (PI3K) qui agissent dans le cytoplasme sur des sucres (*Foster et al., 2003 ; Krugmann et Welch, 1998*). ATM, ATR, DNA-PKcs, et TRRAP possèdent dans leur partie carboxy-terminale un domaine ressemblant au domaine kinase de ces PI3K. Les trois premières ont une activité de phosphorylation des Sérines et Thréonines, sur des cibles qu'elles reconnaissent par un motif S/T-Q-E (*Kim et al., 1999*). Ces cibles sont très variées, et comprennent notamment de nombreux acteurs des points de contrôle du cycle cellulaire. ATM, par exemple, phosphoryle à la fois p53 et son inhibiteur Mdm2, induisant ainsi un arrêt en fin de G1, et éventuellement le début d'un suicide cellulaire (*Maya et al., 2001*). Quelque soit l'étape du cycle cellulaire, ATM phosphoryle une Sérine conservée de l'extrémité carboxy-terminale d'H2AX en cas de cassure double brin de l'ADN (*Burma et al., 2001*).

Les étapes conduisant à la signalisation des DSB ne sont que mal connues, et la place des PIKKs reste difficile à déterminer : certaines études *in vivo* et *in vitro* ont suggéré qu'ATM détecte physiquement la cassure par interaction avec l'ADN, (*Andegeko et al., 2001 ; Smith et al., 1999*). Les travaux de Lee et *al.* renforcent cette hypothèse en démontrant l'activation de la fonction kinase d'ATM en présence d'ADN simple brin (*Lee et Paull, 2005*). Ceci n'est pas sans rappeler le mode d'activation de la DNA-PKcs une autre PIKK. Cependant d'autres résultats suggèrent une activation plus détachée du site de lésion, par autophosphorylation et dissociation d'un dimère inactif (*Bakkenist et Kastan, 2003*). Comme nous l'avons discuté ci-dessus (paragraphe III.c.iii), l'identification récente de facteurs en amont des PIKK suggère que celles-ci assument un rôle de transmetteur plutôt que de détecteur.

Par ailleurs, en l'absence de DSB, ATM existe sous forme d'un multimère inactif, qui ne devient une kinase opérationnelle qu'en réponse à un signal d'activation (*Bakkenist et Kastan, 2003*). Le monomère actif est phosphorylé sur la Sérine 1981, qui participe à la dimérisation d'ATM. Ces observations ont conduit Bakkenist et *al.* à penser que l'activation d'ATM résultait de son autophosphorylation, et du détachement de l'homodimère, suite à l'apparition d'un DSB. Cette théorie est remise en cause par l'observation *in vitro* de dimères d'ATM reconstitués à partir d'un mutant non phosphorylable (S1981A) (*Lee et Paull, 2005*). Ces dimères mutants ont la capacité de phosphoryler p53 en présence de MRN et d'ADN. Il semble donc que la kinase de signalisation soit activée par le contact de l'ADN et la présence de MRN et non par une phosphorylation interne.

On considère généralement que les kinases ATM et ATR partagent les mêmes substrats, mais qu'elles ne répondent pas aux mêmes types de lésions : ainsi ATR est activée en cas d'irradiation UV, tandis qu'ATM détecte et transmet un signal d'irradiation ou d'agent radiomimétique. La première serait donc plus sensible aux lésions simple brin, et la seconde aux DSB. Cependant, cette répartition des rôles est probablement plus complexe, ATR pouvant compenser l'inactivation d'ATM (*Abraham, 2001*).

La fonction de DNA-PKcs reste moins connue dans la signalisation des lésions, et des résultats contradictoires ont été obtenus. Sa fonction kinase est comme celle d'ATM activée au contact de l'ADN (*Durocher et Jackson, 2001*), et serait nécessaire, pour certains à la détection des lésions (*Cheong et al., 1999*), pour d'autres à la réparation par NHEJ (*Chen et al., 2001b*).

ii. L'activation des points de contrôle

Une cellule soumise à des radiations ionisantes voit son cycle cellulaire ralenti ou même arrêté, et il a été montré que cette réaction résulte d'une signalisation active induite par les DSB, et non d'une réponse passive (pour un exemple (*Lucke-Huhle, 1982*)).

Le point d'entrée dans la régulation des points de contrôle est l'activation des kinases Chk1 et Chk2 (Checkpoint kinase 1 et 2) (*Iliakis et al., 2003*). La première est la cible d'ATR en réponse aux lésions (*Liu et al., 2000*), et la seconde celle d'ATM (*Matsuoka et al., 2000*). Des phosphorylations de Chk1 et Chk2 découlent des cascades de signalisation spécifiques. En G1, au cours de la phase S, ou en transition G2/M, la succession de phosphorylations déclenchée est différente mais organisée selon le même schéma. Le détail de chacune de ces cascades a été récemment rapporté par Iliakis et al. (*Iliakis et al., 2003*).

Ainsi, ATM et ATR activent indépendamment Chk1 et Chk2 qui, en retour, ciblent les phosphatases Cdc25A ou Cdc25C, et d'autres acteurs spécifiques de chaque point de contrôle du cycle. L'action de Cdc25A ou Cdc25C bloque dans un état inactif l'hétérodimère formé par une kinase dépendante de cycline (cdk) et sa cycline associée. Ceci empêche la progression du cycle vers l'étape suivante. Par ailleurs, les autres acteurs spécifiques, comme p53 en phase G1 (*Wahl et Carr, 2001*), ou E2F1 en phase S, semblent offrir des voies de régulation alternatives, plus rapides ou complémentaires à la voie Cdc/Cdk.

Le résultat de ces différentes cascades est l'inhibition au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel des acteurs spécifiques de la transition ciblée dans le cycle cellulaire.

iii. Choix entre réparation et apoptose

Les facteurs de réparation et de signalisation de lésions de l'ADN communiquent avec les facteurs apoptotiques. Ces connections ne se limitent pas au mécanisme apoptotique, puisque les mêmes facteurs participent également à l'activation des différents points de contrôle du cycle cellulaire.

Un point commun à tous les types de lésions est l'activation d'une kinase de la famille PIKK. Celles-ci agissent alors sur un ensemble de cibles en relation directe ou indirecte avec la protéine p53, dont le rôle central dans le destin apoptotique d'une cellule est connu (*Norbury et Zhivotovsky, 2004*). p53 est elle-même un substrat d'ATM, ATR et DNA-PKcs en réponse au DSB (*Canman et al., 1998 ; Tibbetts et al., 1999*). De plus, BRCA1 est aussi phosphorylée par ATM en réponse aux radiations ionisantes, et régule la phosphorylation de p53 (*Foray et al., 2003*). La protéine 53BP1, autre cible d'ATM, interagit avec p53 et le stabilise (*Wang et al., 2002*). Enfin, ATM phosphoryle Chk2, qui en retour phosphoryle p53 sur une position qui limite sa dégradation par le protéasome (*Caspari, 2000*).

Cet ensemble de données laisse supposer l'existence de voies catalytiques complémentaires, qui en cas d'activation massive ou prolongée des PIKK, signe de lésions « dangereuses », convergent pour activer fortement la voie apoptotique soumise à p53.

Notons que des facteurs autres que les PIKK interviennent dans la régulation de l'apoptose en réponse aux DSB. La présence du complexe MRN *in vitro* par exemple, active fortement la phosphorylation de p53 dépendante d'ATM (*Lee et Paull, 2004*). Ainsi, MRN pourrait participer à un renforcement du signal d'alerte transmis par ATM, et diriger la cellule vers l'apoptose.

b. Organisation de la chromatine et réparation des DSB

Comme la machinerie de transcription, les facteurs de réparation doivent passer la barrière de la chromatine pour accéder aux sites endommagés. L'inter-connection des processus de réparation et d'organisation de la chromatine est donc logique, mais encore assez peu documentée à ce jour. Un indice est donné par le fait que l'histone H2AX phosphorylé en cas de DSB pourrait modifier la structure chromatinienne (*Fernandez-Capetillo et al., 2003*).

Un des phénomènes les plus étudiés de cette interface est l'ADP-ribosylation des histones par les enzymes PARP-1 et PARP-2 (Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 et 2), en réponse aux différents dommages subit par l'ADN. Parmi d'autres substrats, les histones H1 et H2B reçoivent de ces enzymes de longues chaînes d'ADP-ribose, qui diminuent l'état de compaction de la chromatine (*Ame et al., 2004 ; Poirier et al., 1982*). Les interactions biochimiques de PARP1 et PARP2 avec des protéines de réparation des lésions simples brins sont connues : XRCC1 et l'ADN ligase III en sont des exemples (*Leppard et al., 2003 ; Okano et al., 2003*). En revanche, le rôle des polyADP-ribosylations dans la réparation des cassures double brin est moins clair. Il est avéré par la sensibilité hors du commun aux radiations ionisantes des souris déficientes en PARP-1 (*Shall et de Murcia, 2000*). Récemment, les travaux de Tarlier et al. ont apporté quelques éclaircissements : les polyADP-ribosylations apparaissent dans un noyau sur les sites d'irradiation caractérisés par l'histone γ H2AX, de façon dépendante de PARP-1. Ainsi, un dialogue entre phosphorylation et ADP-ribosylation paraît crucial au bon déroulement de la réparation, ce que confirme le retard de résorption des foyers γ H2AX dans des cellules déficientes en PARP-1 (*Tartier et al., 2003*). De même, la double délétion d'ATM et de PARP-1 (ou ATM et PARP-2) entraîne une létalité précoce au stade embryonnaire qui n'est pas observée chez les mutants indépendants, démontrant l'existence d'une synergie entre les deux processus (*Huber et al., 2004*).

L'ADP-ribosylation des histones ne suffit pas à rendre accessibles les sites de lésions de l'ADN. L'ouverture de la chromatine est également dépendante de deux types de facteurs largement décrits, et impliqués par de récents travaux dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN : il s'agit des facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendant, et des Histones acétyltransferases.

L'ATPase Ino80, qui appartient au premier groupe (voir chapitre I paragraphe III.c.v.1), peut interagir avec γ H2AX sur un site de cassure généré par une endonucléase chez *S. cerevisiae* (*Morrison et al., 2004*). De plus, sa délétion provoque une hypersensibilité aux radiations et aux agents génotoxiques, ce qui est un phénotype caractéristique des facteurs de réparation. Cependant, le rôle d'Ino80 chez les eucaryotes supérieurs est probablement plus complexe, puisque une telle « radiosensibilité » n'est pas retrouvée chez un mutant Δ INO80 d'*Arabidopsis thaliana*. Chez cette espèce cependant, la recombinaison homologue des DSB est spécifiquement affectée, indépendamment de la régulation transcriptionnelle des gènes liés à la réparation (*Fritsch et al., 2004*). Il semble donc qu'Ino80 contrôle en particulier l'accès à la chromatine des facteurs de recombinaison homologue. Par ailleurs, la présence des hélicases Ruvb1 et Rvb2, qui sont liées à la résolution des croisements Holliday, dans le complexe Ino80 de levure conforte cette hypothèse (*Shen et al., 2000*).

Chez l'homme, le facteur anti-cancéreux spécifique BRCA1 interagit avec le complexe BAF, un autre complexe de remodelage de la famille SWI/SNF (*Bochar et al., 2000*). BRCA1 est un partenaire de RAD50 et RAD51 qui apparaît dans les foyers γ H2AX, et s'intègre sans un complexe multifonctionnel avec d'autres facteurs de réparation (*Wang et al., 2000*).

Parallèlement, des liens existent entre les facteurs d'acétylation des histones et de réparation. Cependant, l'interprétation de ces résultats doit être prudente : malgré leur nom, les Histone Acétyltransferases régulent aussi des substrats indépendants de la chromatine. Leur rôle dans la réparation n'est donc pas systématiquement de faciliter l'accès aux lésions par la modification des histones et l'ouverture de la chromatine. Il peut aussi mettre en jeu des processus indirects via la régulation de l'expression, l'activité, ou la dégradation de facteurs protéiques.

Par exemple chez la levure, la mutation simultanée d'HAT1 et de résidus Lysines spécifiques sur H3 cause une hypersensibilité au traitement génotoxique, qui n'apparaît pas en cas de mutations indépendantes. Ceci suggère qu'HAT1, qui est spécifique des histones néosynthétisés, participe avec la partie amino-terminale d'H3 à la réparation par HR des cassures double brin (*Qin et Parthun, 2002*). Néanmoins, ceci n'est pas la preuve d'un rôle de l'acétylation d'H3 par HAT1 dans la réparation par HR. L'intervention d'une cascade de régulation intermédiaire déclenchée par HAT1 et débouchant sur l'acétylation d'H3 ne peut être exclue.

Également, l'inactivation de l'activité HAT de Gcn5 chez la levure provoque une sensibilité accrue aux agents alkylants (*Choy et Kron, 2002*).

Le rôle d'Esal et Tip60 dans la réparation des DSB paraît plus clairement établi. En effet, certaines mutations d'Esal rendent les souches de levure anormalement sensibles aux DSB (*Bird et al., 2002*), et la délétion du domaine HAT de *hsTip60* met à mal la réparation des cassures double brin (*Ikura et al., 2000*). Une étude récente menée chez *D. melanogaster* montre que dTip60 acétyle l'histone H2Av phosphorylé (homologue de *hsγH2AX*). Ceci permet son échange dans le nucléosome contre un exemplaire non modifié par l'ATPase p400/Domino, associé à Tip60 dans le complexe déjà caractérisé TIP60 (*Kusch et al., 2004*). Cet événement pourrait être le signal de complétion du processus de réparation, pour laquelle la coopération d'une enzyme d'acétylation et de remodelage est nécessaire.

En accord avec le rôle des HAT dans la réparation, certaines déacétylases pourraient aussi intervenir, suggérant qu'une régulation fine de l'état d'acétylation est nécessaire au bon déroulement du processus. Identifié à l'origine comme un répresseur de la transcription, chez la levure, la dé-acétylase Sin3 est nécessaire à la réparation de DSB par le mécanisme impliquant Hdf1, l'homologue de Ku70 (*Tsukamoto et al., 1997*). Ce résultat a été confirmé récemment par l'étude de la dé-acétylation de la lysine K16 d'H4 au alentour d'un DSB (*Jazayeri et al., 2004*). De façon différente, l'activité de Gcn5 semble régulée par la DNA-PKcs, qui phosphoryle l'enzyme et diminue son activité (*Barlev et al., 1998*). Les conséquences de cette régulation ne sont pas connues à ce jour.

Enfin, le facteur de réparation par recombinaison homologue RAD54 est lui-même une ATPase de la famille SWI/SNF. En collaboration avec RAD51, RAD54 est capable de faire glisser les nucléosomes sur l'ADN, sans pour autant que cet ADN soit endommagé. Cette activité de remodelage pourrait être utile au processus de re-ligation, mais aussi à la recherche d'une séquence modèle sur une chromatide homologue pour la réparation par HR (*Alexeev et al., 2003*).

L'ensemble de ces données décrit une coopération importante entre les facteurs de réparation et de remodelage, suggérant la nécessité pour les premiers d'intervenir dans un contexte chromatinien favorable, mais aussi l'importance de rétablir un état « de repos » de la chromatine après la réparation.

c. Transcription et réparation des DSB

La réponse cellulaire à des lésions du génome comprend sans grande surprise un changement du niveau d'expression d'un grand nombre de gènes (*Amundson et al., 2001*), parmi lesquels certains facteurs de réparation dont l'expression est nettement stimulée (*Otomo et al., 2004*).

Notons par ailleurs que TRRAP est aussi surexprimée dans des lymphocytes humains provenant d'individus soumis à un stress génotoxique (*Sakamoto-Hojo et al., 2003*).

Les répercussions des DSB sur la transcription de l'ensemble du génome empreintent probablement les chemins de régulation classiques. La régulation de l'organisation de la chromatine, évoquée ci-dessus en est un. L'activation de co-facteurs de transcription spécifiques est une autre voie. De très

nombreux travaux ont visé à montrer l'activation de certains facteurs en réponse aux radiations ionisantes, mais à des doses souvent létales. La synthèse de ces résultats et leur comparaison à des expériences à faible dose de radiation montrent aujourd'hui que 3 facteurs sont activés de façon certaine en cas de DSB : NF- κ B, p53 et les RCPs (SP1-related Retinoblastoma Control Proteins) (*Criswell et al., 2003*).

p53 régule en retour un ensemble de gènes qui vont entraîner la cellule vers un arrêt du cycle cellulaire ou un suicide, selon le type cellulaire et l'importance des lésions.

NF- κ B, une fois activé par la dégradation de son inhibiteur I- κ B, se lie sous forme de décimère sur un grand nombre de gènes possédant un domaine de reconnaissance spécifique. Parmi ceux-ci, les gènes activés en réponse aux radiations ionisantes, tels que TNF α , IL1 α , IL1 β et IL6 appartiennent au mécanisme de réponse inflammatoire. Un phénomène encore mal compris est la régulation par NF- κ B de la radiosensibilité des cellules (*Jung et Dritschilo, 2001 ; Kim et al., 2005*).

Indépendamment, la transcription en cours au niveau du site de cassure est arrêtée le temps de la réparation. Une cassure difficile à réparer et une prolongation de cet arrêt déclenche la dégradation de l'ARN polymérase bloquée sur l'ADN (*Lu et al., 2002*). Bien que ces observations n'aient pas été faites dans le cas précis de DSB, la nécessité d'un tel contrôle de la transcription laisse supposer qu'il soit indépendant du type de lésion. De façon concordante, les ARN polymérases I et II voient leur activité inhibée par l'action de la kinase activée par les DSB DNA-PKcs (*Jin et al., 1997*).

d. Réplication et réparation des DSB

Si une cassure double brin de l'ADN intervient en phase S pendant la réplication de l'ADN, les risques d'introduire et de propager des anomalies génétiques (chromosome tronqué par exemple) sont très élevés. Réplication et réparation de l'ADN sont donc intimement liées, au point que nombre de protéines participent aux deux procédés (*Toueille et Hubscher, 2004*). L'arrêt d'un complexe de réplication qui rencontre une lésion est probablement le signal d'activation des points de contrôle de la phase S, et de la machinerie de réparation. Ce signal aboutit finalement à l'inhibition des origines de réplication encore inertes durant la réparation, dans une sorte de contrôle rétroactif (*Larner et al., 1997*).

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et RPA (Replication Protein A) sont des facteurs de réplication que l'on sait essentiel à la signalisation des lésions de l'ADN. PCNA participe à l'activation du point de contrôle d'entrée de phase S et colocalise avec les foyers de réparation (*Meister et al., 2003*). RPA, quant à elle, est essentielle à la réplication, mais aussi à la réparation des différents types de cassure, par sa capacité à former des filaments sur les extrémités simple brin d'ADN. Sa participation à la recombinaison homologue est suggérée par plusieurs études, qui démontrent notamment des interactions avec Rad51 et Rad52 sur les sites de DSB (*Wang et Haber, 2004*).

Enfin, quelques facteurs de réparation forment des complexes identifiés récemment qui pourraient agir sur les sites de cassure à la manière du complexe de réplication. Par exemple, Le complexe 9-1-1 (Rad9/Hus1/Rad1) forme une pince similaire au complexe homotrimérique PCNA, tandis que Rad17 se lie aux sous-unités 2 et 5 du complexe RFC (Replication Factor C), dont le rôle est d'installer la pince PCNA sur l'ADN (*Shiomi et al., 2002*). Un modèle intéressant propose que Rad17-RF-C2-5 permette l'installation de la pince 9-1-1 sur l'ADN endommagé. 9-1-1 servirait alors de point d'attache pour les facteurs de signalisation telles que les Chk (*Melo et Toczyski, 2002*), et par la suite l'ensemble des « effecteurs » de la réparation. La présence du complexe RFC engagé dans la réplication à proximité des sites à réparer au moment de la détection ne peut que faciliter l'initiation de ce processus.

PARTIE I : RESULTATS : PUBLICATION

PARTIE I : RESULTATS NON PUBLIES :

I. *Analyse par spectrométrie de masse des partenaires de TRRAP indépendant de TFTC.*

À l'origine de ce travail, nous désirions comprendre le rôle de TRRAP par l'identification de ses partenaires *in vivo*, c'est à dire les protéines en interaction directe ou indirecte avec elle. Dans ce but, nous avons entrepris de purifier par immunoprécipitation d'extrait nucléaire les facteurs liés à TRRAP mais indépendant de TFTC/PCAF/STAGA. Le principe et le mode opératoire de cette purification sont décrits dans la publication jointe à cette partie. L'échantillon obtenu a été soumis à une analyse par spectrométrie de masse, et les protéines ont été identifiées par l'analyse d'empreintes de masse peptidique (« peptide mass fingerprinting », PMF). Cependant, MRN n'étaient pas le seul partenaire potentiel de TRRAP intéressant.

Trois analyses successives sur trois échantillons similaires ont été réalisées par nos soins, et ont donné lieu à des résultats très riches (voir [Figure 21](#)). Parmi eux, l'identification de Mre11, Rad50 et Nbs1 nous a incité à rechercher des liens fonctionnels entre TRRAP et la réparation des cassures double brin de l'ADN (voir publication).

Les autres résultats résumés dans la [Figure 21](#) confirment des données existantes dans la littérature, à la fois concernant la présence de TRRAP dans certains complexes, mais aussi son implication dans la transcription. Ils élargissent aussi le champ d'investigation en suggérant de nouvelles interactions fonctionnelles. Chaque protéine citée a été identifiée une ou plusieurs fois, avec un recouvrement peptidique et une précision sur la mesure de masse significatifs. Les protéines de fonction inconnues dans les banques de données ont été soumises à une recherche d'homologie par BLAST, permettant de donner quelques indices de fonction dans la colonne « commentaire » de la [Figure 21](#). Les paragraphes qui suivent visent à commenter ces résultats.

a. Les sous-unités de SWI/SNF :

Il est particulièrement important de noter la présence de nombreuses sous-unités du complexe ATPase SWI/SNF dans cette purification (BAF250, BAF170, hSnfa5, BAF57, BAF47). Elle illustre le caractère assez périlleux de cette méthodologie. En effet, la spectrométrie de masse ne fait pas de distinction entre les partenaires spécifiques et les protéines introduites ou restées dans l'échantillon du fait de la méthode de purification. Elles peuvent se lier de façon aspécifique à la résine d'IP, ou être introduites au contact de l'extérieur (peau du manipulateur principalement), après l'étape de purification. De notre expérience, les sous-unités de SWI/SNF font partie des premières. D'une part, elles apparaissent dans un nombre anormal d'immunoprécipitations usant d'anticorps dirigés contre des facteurs sans lien avec SWI/SNF. D'autre part, elles ne sont pas retrouvées par WB après des lavages plus stringents des résines d'IP. Enfin, pour confirmer cette interprétation, une interaction directe de TRRAP avec l'un de ses facteurs n'a pas été rapportée jusqu'ici.

N°	Nom/sigle de la protéine	Code gi	commentaires	Occurrence
1	TRRAP			3
2	BAF250		présent dans SWI/SNF	1
3	BRG1		présent dans SWI/SNF	1
4	BAF170		présent dans SWI/SNF	2
5	BAF47		présent dans SWI/SNF	2
6	BAF57 (Rsc6)		présent dans SWI/SNF	1
7	BAF53a		présent dans TIP60	3
8	Actine Béta		présent dans TIP60	2
9	p400		présent dans TIP60	2
10	DMAP1		présent dans TIP60	2
11	TIP49		présent dans TIP60	1
12	TIP48		présent dans TIP60	1
13	hyp protein XP039324	14781172	très forte homologie avec TRCp120, double bromodomaine	1
14	MOZ		HAT de la famille MYST	1
15	Ubp8	4827054	présent dans SAGA	1
16	hTaf2		présent dans TFIID	1
17	SAP130		contaminant ?	1
18	Rad50		présent dans MRN	2
19	Nbs1		présent dans MRN	1
20	Mre11		présent dans MRN	1
21	ATRX, RAD54 homologue		helicase, probable co-facteur de transcription. Lié à l'alignement des chromosomes en mitose	1
22	CSR	6230379	réponse au stress oxydant, comportement de récepteur	1
23	hyp protein XP001713	1596867	domaine lié à la ségrégation des chromosomes + ATPase similarité avec Tpr	1
24	p30 DBC	21739643	très forte homologie avec DBC1, suppresseur de tumeur, muté dans les cancers du sein et du colon	2
25	CRCM	4505129	protéine mutée dans de nombreux cancers colorectaux	1
26	hyp protein	16551981	domaines ZnF et KRAB	1
27	Zn finger prot 108	9055388	domaines KRAB, ZnF et SFP1	1
28	GIOT4(KOX 6)	13652275	domaine ZnF	1
29	hyp protein KIAA1198	6330394	forte homologie avec GIOT4. Znf, KRAB	1
30	hyp protein FLJ32191	22095393	domaine KRAB et ZnF, homologie avec SFP1 : potentiel régulateur transcriptionnel de la transition G2/M	1
31	hyp protein KIAA0088	577295	très forte homologie avec l'alpha-glucosidase : maturation des glycoprotéines dans le RE	1
32	Chromogranine	14771850	précurseur de peptide actif, dans les granule sécrétoire neuroendocrine	1
33	Alpha2 macroglobulin receptor	24763	lié au récepteur des LDL	1
34	5'nucleotidase	4505467	hydrolyse des nucléotides extracellulaires, disfonction dans certaines leucémies	1
35	GIOT2	16176193	possible co-facteur de la transcription, contient ZnF et KRAB	1
36	hyp protein AL833924	21739477	domaine SET, homologie avec MLL3	1
37	hyp protein KIAA1980	18916877	répétition TRP	1
38	hyp protein FLJ11078	20071160	répétition Kelch, similarité avec KBTBP2	1
39	hyp protein FLJ10498	14727469	?	1
40	eif béta		facteur d'initiation de la traduction	1
41	eIF3	3123230	facteur d'initiation de la traduction	1
42	DEAH box RNA helicase	3023637	facilite l'export des ARNm	1
43	GTF2IRD1	15011924	appartient à la famille TFII-F, lié au syndrome de Willim Beuren	1
44	NALP1	21450725	réaction inflammatoire activée par NFkappaB et les caspases	1
45	hyp protein KIAA1813	14017843	domaines Fze1 (leucine zipper), homologie avec LAPSER1	1
46	hyp protien XP_303364	30155331	homologie localisée avec une phospholipase	1

Figure 21 : **Synthèse des résultats de spectrométrie de masse.**

Les différentes protéines identifiées ont été classées par affinité de fonction. Occurrence : nombre d'identification pour 3 analyses indépendantes.

b. TRRAP dans le complexe TIP60 :

Dans les trois analyses réalisées apparaissent des sous-unités du complexe TIP60 (p400, BAF53a, actine β , DMAP1, Tip49, Tip48). Nous confirmons ainsi l'association stable de TRRAP avec ces facteurs qui entourent l'HAT Tip60, indépendamment des complexes contenant TAF10.

Un autre facteur, TRCp120 (Figure 21, N° 13), a été identifié très récemment sous le nom de Brd8, en interaction avec les autres sous-unités de TIP60 (Doyon *et al.*, 2004). Nous retrouvons dans notre surnageant une protéine qui lui est très similaire. Cependant les peptides détectés dans cette analyse précisément couvrent uniquement la moitié amino-terminale de la protéine. La partie carboxy-terminale contient de nombreux sites de digestion trypsique, donc devrait être recouverte par l'analyse. Il pourrait s'agir d'un variant inconnu jusqu'à maintenant dépourvue de cette partie ou possédant une extrémité c-term différente.

c. Co-facteurs de transcription, suppresseurs de tumeur et oncogènes :

TRRAP est connue pour interagir avec des activateurs de la transcription, dont certains sont liés à la transformation cancéreuse (c-Myc, E1A). Nos analyses tendent à confirmer qu'il s'agit d'un rôle bien spécifique de TRRAP : plusieurs protéines hypothétiques identifiées sont des suppresseurs de tumeur (N°24 : DBC1, N° 25 : CRCM), un autre pourrait être un régulateur du cycle cellulaire (N°30), et enfin un bon nombre contient des motifs doigts de zinc simples et KRAB (N°28 : Giot4, N°29 : homologue de Giot4). Les motifs ZnF sont caractéristiques des facteurs de transcription, et les motifs KRAB particuliers des répresseurs de la transcription.

d. Facteurs liés à la réparation ou à la condensation de l'ADN :

MRN mis à part, nous remarquons aussi trois partenaires potentiels de TRRAP qui sont impliqués soit dans la ségrégation des chromosomes (Figure 21 N° 21 et 23), soit activée en réponse à un stress oxydant (N°22). Notons par ailleurs, que la protéine ATRX pourrait être un régulateur de la transcription, en rapport avec l'ouverture de la chromatine (Park *et al.*, 2004). Elle serait même particulièrement requise pour l'alignement des chromosomes et la formation des fuseaux pendant la méiose (De La Fuente *et al.*, 2004). Ceci n'est pas sans rappeler le phénotype de défaut de ségrégation des chromosomes chez les cellules murines *trrap*^{-/-}.

Il ne serait pas surprenant que TRRAP soit impliquée dans les processus liés à l'organisation de la chromatine d'une part durant la division cellulaire, et d'autre part en cas de stress génotoxique.

e. sous-unités de TFTC ?

Une protéine nommée Ubp8 (Ubiquitine protease 8) a été identifiée dans ces analyses. Ceci est particulièrement intéressant car une protéine de levure, spécifique de la dé-ubiquitylation d'H2B et portant le même nom participe à SAGA (Henry *et al.*, 2003). Malgré l'homonymie, ces deux protéines ne sont pas des orthologues : *scUbp8* est plus similaire à *hsUbp22* qu'à *hsUbp8*.

Par ailleurs, les sous-unités de TFTC ou STAGA devraient être absentes, suite à l'élimination des facteurs liés à TAF10 durant la purification. La présence d'*hsUbp8* suggère pour le moins que TRRAP est

associée à une dé-ubiquitylase chez l'homme comme chez la levure. Elle laisse supposer, de plus, qu'une structure dérivée de TFTC (sans TAF10) puisse exister *in vivo*. Cette hypothèse n'est pas totalement incongrue si l'on note qu'un autre partenaire de TRRAP révélé par nos analyses (N°42) participe à l'export des ARN messagers, comme la sous-unité Sus1 de SAGA (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2004). Ubp8 et Sus1 forment dans le complexe SAGA une entité à part car plus modulable et dotée d'une fonction propre.

f. Conclusion

L'ensemble de ses observations donne une vision assez cohérente de la fonction de TRRAP, entre transcription, modification de la chromatine et réparation de l'ADN. Elle offre aussi de nombreuses hypothèses de travail, qui nécessiteront des confirmations biochimiques avant d'être sérieusement abordées sur le plan fonctionnel.

II. *Etudes biochimiques du co-facteur de la transcription TRRAP dans la réparation des cassures double brin de l'ADN :*

- a. En cas de DSB, TRRAP est elle plus exprimée et quantitativement plus associée à MRN ?

Dans une étude d'expression génique (criblage de puce ADN), il a été observé que le gène *trrap* était activé dans les lymphocytes d'individus exposés accidentellement à des radiations ionisantes (RI) (Sakamoto-Hojo *et al.*, 2003). Ceci nous a incité à évaluer l'expression de la protéine dans des cellules humaines en culture, soumises artificiellement à une irradiation.

Des lymphoblastoïdes humains normaux (AHH-1) ont été irradiés à hauteur de 10 Grey par une source de Césium. Une autre fraction non irradiée servait de contrôle négatif. Après quelques heures de récupération, des extraits protéiques totaux furent préparés et analysés par WB. De cette façon, nous n'avons observé aucun changement visible de la quantité de protéine TRRAP ou de ses caractéristiques de migration.

L'apparente contradiction de nos résultats avec ceux de Sakamoto *et al.* peut s'expliquer simplement. D'une part, nous avons quantifié la protéine présente dans une population de cellules, tandis que l'expérience rapportée mesurait la quantité d'ARN messager. D'autre part, les cellules utilisées dans les deux cas sont différentes : notamment, elles proviennent d'un organisme qui a été globalement exposé aux RI dans l'étude de Sakamoto *et al.* Il est possible que la surexpression du gène *trrap* observée dans ce cas résulte d'une régulation extracellulaire aboutissant uniquement dans les

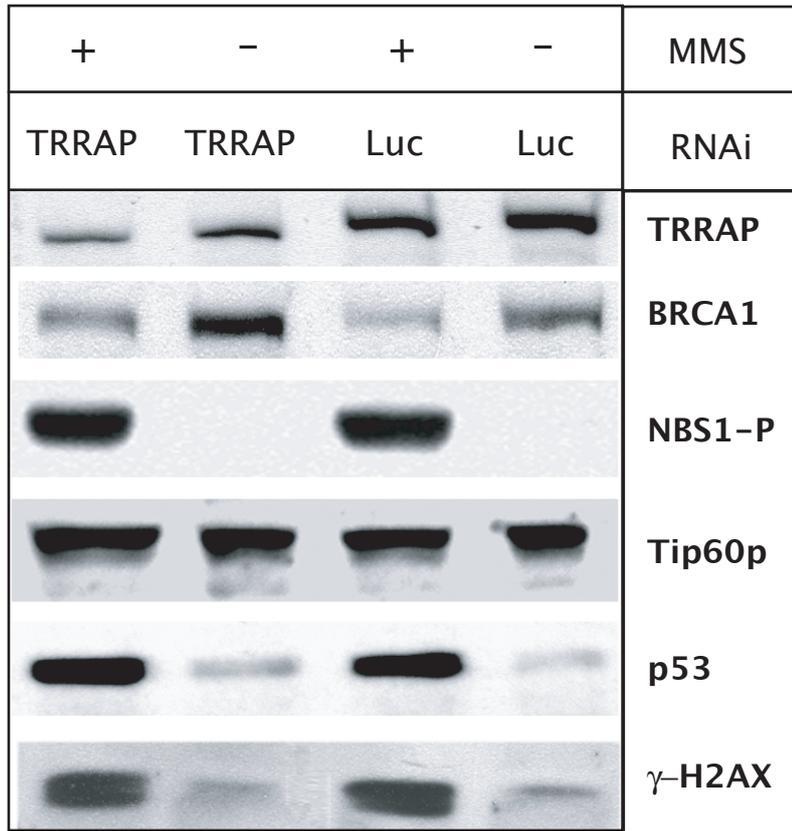


Figure 22A : Expression de facteurs liés à la réparation en cas de traitement génotoxique, et d'inhibition de TRRAP.

Des quantités égales d'extrait protéique total, ou d'extrait acide (pour H2AX) ont été résolues sur un gel d'acrylamide 8% (TRRAP et NBS1-P), 15% (H2AX) ou 10% (BRCA1, p53, Tip60).

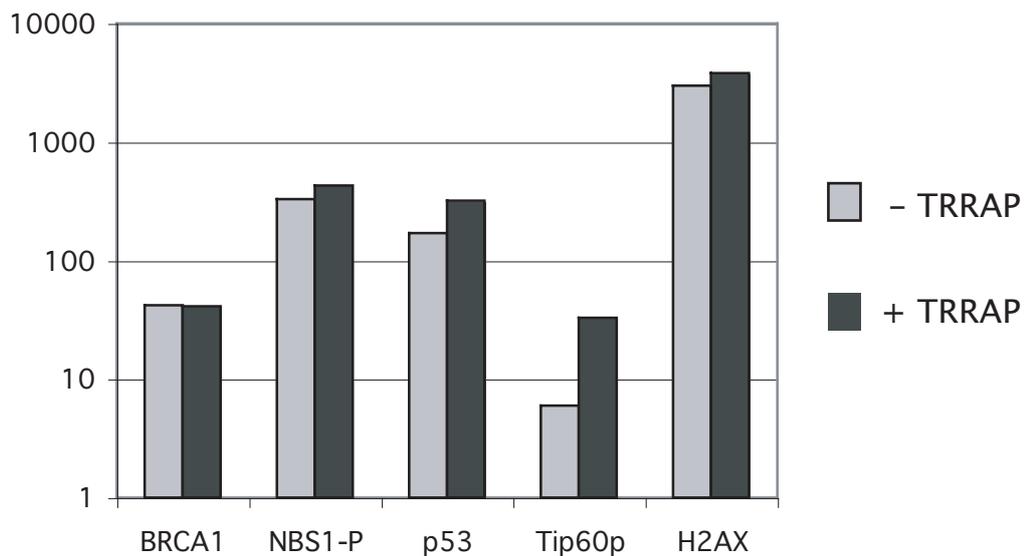


Figure 22B : Quantification de l'induction moyenne des facteurs testés, après l'induction de DSB. L'intensité du signal WB pour chaque facteur et chaque condition de traitement des cellules a été quantifiée deux fois, pour deux expériences indépendantes, par rapport à un contrôle sur le même gel. La série gris clair représente la moyenne d'induction de la protéine (%) par le traitement MMS, si TRRAP est inhibée. La série gris foncé représente la moyenne d'induction de la protéine (%) par le traitement MMS, sans inhibition de TRRAP. L'échelle des abscisses est logarithmique.

lymphocytes. De façon concordante, le gène n'est pas activé dans des fibroblastes irradiés en culture (Sakamoto-Hojo *et al.*, 2003).

Par ailleurs, notre approche assez simple n'exclut pas que la protéine soit modifiée en cas d'irradiation. Elle contient en effet un très grand nombre de sites potentiels de modification post-traductionnelle. Sa grande taille (400 kD) et le pouvoir résolutif limité des gels d'acrylamide ne permettent pas de distinguer une forme modifiée par WB.

Une méthode plus appropriée consisterait à soumettre les extraits nucléaires de cellules irradiées et non irradiées à une IP contre TRRAP, en quantité suffisante pour une analyse par spectrométrie de masse. La protéine isolée et digérée, il deviendrait alors plus simple de chercher des peptides modifiés en cas d'irradiation, par comparaison des spectres de chaque échantillon.

Par ailleurs, nous avons réalisé des immunoprécipitations contre TRRAP et Mre11 à partir des extraits protéiques totaux de cellules irradiées, décrits ci-dessus : il semble que Mre11 et Nbs1 soient co-précipités par TRRAP de la même façon indépendamment de l'irradiation. Et inversement, TRRAP est co-précipité par Mre11 sans changement notable. Ainsi, l'affinité de TRRAP pour MRN, et *vice-versa*, ne semble pas être influencée par la présence de DSB *in vivo*.

b. TRRAP influence-t'elle l'état de phosphorylation de NBS1 et H2AX, et l'expression de facteurs de réparation, en cas de traitement génotoxique ?

Il est connu que les kinases de la famille PIKK, comme ATM et DNA-PKcs, régulent l'activité de nombreux effecteurs de la réparation des DSB. Malgré l'absence très probable du site de kination dans sa séquence, TRRAP pourrait indirectement influencer l'état de phosphorylation et donc l'activité de ces mêmes effecteurs. Nous avons choisi de tester plusieurs de ces cibles : Nbs1, H2AX, p53, BRCA1 et Tip60p.

Dans ce but, nous avons réduit la quantité de protéine TRRAP dans des cellules HeLa par interférence ARN (siRNA « small interfering RNA »). 48h après traitement, le taux d'inhibition était d'environ 50 % (Figure 22A, première ligne). À ce moment, les cellules étaient soumises à un traitement au méthylméthane sulfonate (MMS) pendant 1h.

Le méthylméthane sulfonate est un agent alkylant des bases, qui crée des cassures double brin indirectement. La présence d'un groupement alkyl sur la base induit une cassure simple brin qui peut devenir une cassure double brin lors de la réplication. L'exposition à une dose importante de MMS provoque des cassures double brin, ce que prouve la présence de la forme phosphorylée de l'histone variant H2AX, et la phosphorylation de Nbs1 en position S343 (Figure 22A).

Les cellules récoltées après traitement ont été séparées en deux fractions pour préparer d'une part, un extrait protéique total, et de l'autre, un extrait en condition acide pour isoler les histones. L'expression de différents facteurs a été testée par western blot. Enfin, la concentration des extraits a été mesurée pour normaliser les quantités déposées, et chaque quantification est réalisée par rapport à un contrôle (un facteur non lié et révélé sur la même membrane).

Les résultats obtenus sont résumés sur la Figure 22. Le panneau A représente une expérience pour chaque facteur testé, tandis que le panneau B donne les moyennes de quantification après deux expériences, et deux quantifications par expérience. Nous n'avons détecté aucune variation concordante de Nbs1 phosphorylée ni de γ H2AX dépendante de l'inhibition de TRRAP. Ainsi, TRRAP ne semble pas être impliquée, directement ou indirectement, dans la phosphorylation de Nbs1 et H2AX.

Les facteurs BRCA1, p53 et Tip60p ont aussi été révélés pour l'une des expériences. Comme le montrent les moyennes de quantification (Figure 22B), seule l'expression de Tip60 semble varier avec l'inhibition de TRRAP en cas de DSB. Cependant, il s'agit ici d'un résultat préliminaire, qui doit être confirmé.

Notons enfin que cette expérience laisse de côté un paramètre important : Les cellules rendues apoptotiques par le traitement au MMS et la transfection de siRNA ne sont pas prises en compte. Si TRRAP influence spécifiquement ce processus en cas de DSB, nous n'avons pas établi notre expérience de façon à l'observer. C'est un défaut qu'il faudrait corriger dans de nouvelles expériences, par exemple en collectant après traitement autant les cellules flottantes que les cellules attachées.

Ainsi, TRRAP ne semble pas influencer les mêmes cibles que les autres PIKK, en cas de cassures double brin de l'ADN. Cependant, il serait intéressant d'étudier plus précisément le devenir de Tip60p (expression et MPT) en cas de DSB, notamment dans des cellules *trrap*^{-/-}. En effet, le rôle de cette HAT dans la réparation est connu depuis peu, mais les mécanismes qui régulent son action ne sont pas encore identifiés

c. TRRAP est-elle relocalisée dans des foyers de réparation des DSB comme d'autres facteurs de réparation ?

L'observation de foyers de réparation en immunofluorescence dans le noyau de cellules irradiées est un des moyens les plus utilisés pour caractériser les mécanismes de réparation. Ces foyers sont localisés par la détection de γ H2AX, qui apparaît très vite et en grande quantité autour des sites de cassure. Sachant que de nombreux facteurs de réparation, dont MRN et BRCA1, rejoignent ces foyers, nous avons voulu savoir si TRRAP faisait de même à la suite d'un stress génotoxique.

Plusieurs méthodes ont été mises en place pour cette expérience : l'irradiation classique par une source radioactive, et la création de cassures double brin localisées par irradiation laser.

Dans un premier temps, nous avons collaboré avec l'équipe du Dr Dora Papadopoulou (Institut Curie, Paris), et notamment avec Céline Jacquemont, pour mettre en place un protocole d'irradiation classique. Des cellules lymphoblastoïdes humaines normales ont été soumises comme précédemment à une irradiation par une source de Césium, à différentes doses. Un temps de récupération variable leur était laissé dans un milieu de culture frais, puis une préparation d'immunofluorescence a été réalisée. Les cellules fixées pour l'observation par microscopie de fluorescence ont été marquées par des anticorps contre le variant d'histone γ -H2AX ou la protéine BRCA1, et contre TRRAP.

À différents temps après irradiation, et avec différents traitements de perméabilisation des cellules, nous n'avons pas observé de co-localisation de TRRAP avec les foyers γ -H2AX, caractéristiques de la réparation des cassures double brin de l'ADN.

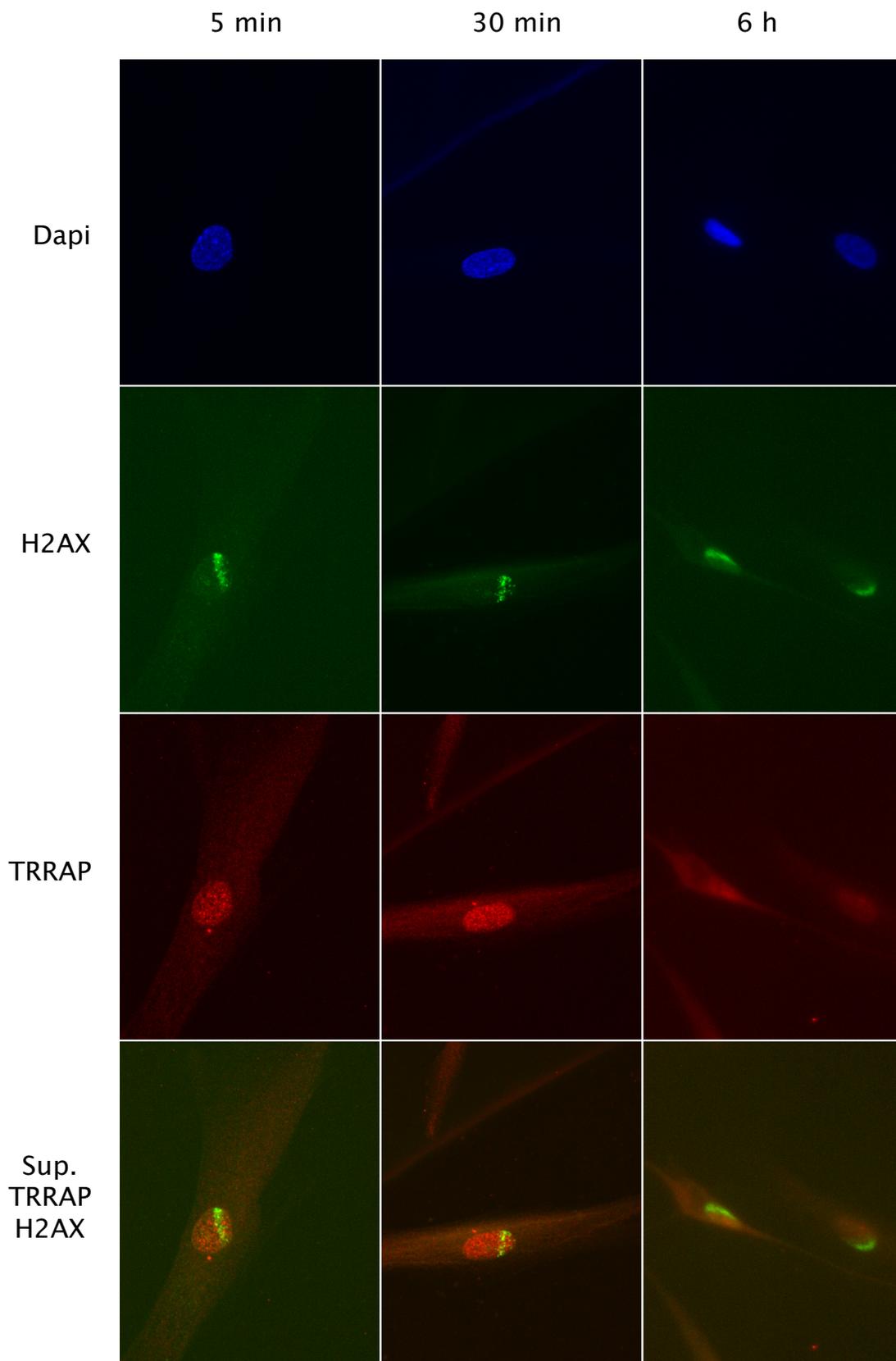


Figure 23 : **Localisation in vivo de TRRAP et H2AX phosphorylé après irradiation locale au laser**
 Des fibroblastes ont été irradiés par un laser UV en présence de colorant Hoechst, puis fixé après un laps de temps indiqué en haut de la figure. Puis ils sont été mis au contact d'anticorps dirigés contre TRRAP et H2AX phosphorylé, et marqué au Dapi. La dernière ligne montre la superposition des images obtenues pour TRRAP et H2AX phosphorylé.

Pour compléter cette étude, et se libérer de certains doutes inhérents à la technique précédente, nous avons mis au point un protocole alternatif, avec l'aide de l'équipe du Dr de Murcia (ESBS, Illkirch). Dans cette expérience, des fibroblastes humains ont été irradiés localement à l'aide d'un laser très fin et en présence de colorant Hoechst (méthode adaptée de (Rogakou *et al.*, 1999)). Il a été montré que ce traitement crée des cassures double brin de l'ADN sur le tracé du laser, facilement repérables dans le noyau des cellules. Comme précédemment, les cellules sont laissées un temps variable (5 min, 30 min ou 6h) dans un milieu de culture frais, puis sont préparées pour une observation en immunofluorescence.

De même que dans l'expérience précédente, nous avons observé la formation de foyers de réparation par la re-localisation de γ H2AX (Figure 23). En revanche, TRRAP qui était visiblement nucléaire, n'apparaissait pas plus concentrée sur les zones irradiées.

Les marquages dus à l'anticorps anti-TRRAP sont majoritairement nucléaires, et semblent donc spécifiques. Nous supposons que si un recrutement de TRRAP au site de réparation des DSB de l'ADN existe, il concerne une sous-population minoritaire, qui ne serait pas détectable par immunofluorescence. Selon une autre hypothèse, la re-localisation de TRRAP pourrait être un phénomène très dynamique, qui interviendrait trop tôt dans la réponse aux DSB pour que nous puissions l'observer.

d. Les complexes MRN et TRRAP-MRN reconstitués ont-ils la capacité de réparer l'ADN par end-joining *in vitro* ?

Dans l'étude de TRRAP, une autre hypothèse de travail supposerait qu'elle influence l'activité du complexe MRN, en interagissant avec lui. Pour tester cela, nous avons voulu comparer l'activité de réparation par end-joining de MRN et TRRAP-MRN.

Grâce au Dr Masson de l'Université de Laval (Québec), nous avons pu reconstituer le complexe MRN *in vitro*. Ses vecteurs baculovirus recombinants, infectants des cellules d'insectes, ont permis de surproduire Mre11 et Nbs1 avec beaucoup d'efficacité. En revanche, la protéine Rad50 recombinante était moins exprimée malgré des conditions d'infection plus favorables (titre de virus plus élevé). Cependant, nous avons pu réaliser des infections combinées avec les trois vecteurs, et purifier le complexe par affinité pour une colonne Ni-NTA (IMAC-Ni : Immobilized Metal Affinity Chromatography Nickel). En effet, Mre11 et Rad50 recombinants portent à l'extrémité carboxy-terminale une étiquette de 6 histidines qui peut entrer dans la sphère de complexation d'un ion nickel. Ainsi, nous avons obtenu un complexe MRN partiellement purifié en une étape.

Par ailleurs, il a été possible d'infecter les cellules d'insecte avec un virus portant la séquence codante de *trrap* en même temps que les virus de Mre11, Rad50 et Nbs1. Malgré la faible expression de TRRAP (due certainement à sa grande taille), une IP sur l'extrait protéique de ces cellules a permis d'isoler un complexe TRRAP-MRN, décrit dans la publication jointe (partie précédente).

Ces deux « complexes » MRN, TRRAP-MRN, ainsi que le complexe MRN purifié au laboratoire du Dr Masson (contrôle) ont été ajoutés à la réaction de NHEJ *in vitro* décrite dans la publication (partie précédente). MRN autant que TRRAP-MRN donnent à l'extrait

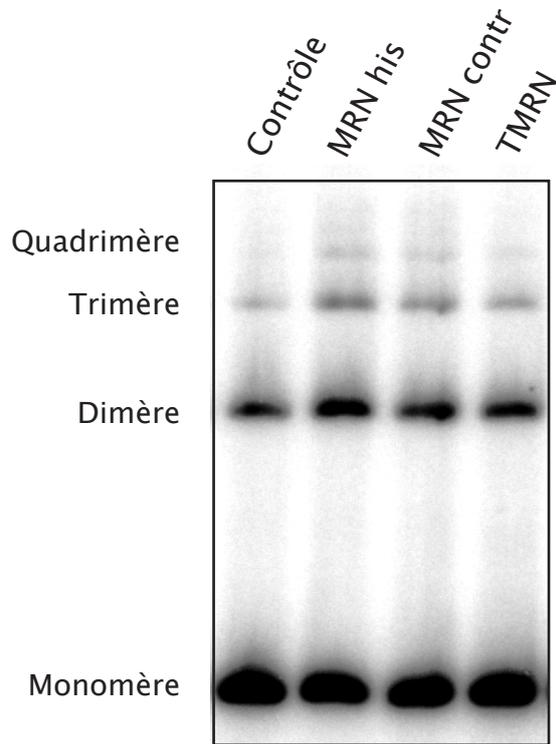


Figure 24 : **Reconstitution de l'activité "end joining" in vitro par le complexe MRN recombinant.** Les complexes MRN purifié par nos soins (MRN his) ou purifié par l'équipe du Dr Masson (MRN contr) sont ajoutés à une réaction d'end joining in vitro, en présence d'extrait de cellules AHH-1, d'ATP, et d'un fragment d'ADN double brin purifié. Le contrôle contient le tampon de dialyse des complexes.

de lymphoblastoïdes AHH-1 présent dans la réaction une activité nettement plus importante que le contrôle (Figure 24).

Cette observation est un résultat non négligeable. Le complexe de *S. cerevisiae* reconstitué *in vitro* montre la même activité de « end joining » (Chen *et al.*, 2001a), néanmoins le rôle de MRN dans la réparation par NHEJ chez les mammifères est encore aujourd'hui discuté par les experts. Nous apportons la preuve qu'un complexe recombinant est tout aussi favorable au « end joining » que le complexe de levure, du moins pour la réparation de cassure avec des extrémités simple brin non dégradées.

De plus, le complexe TRRAP-MRN favorise aussi l'activité NHEJ, ce qui suggère que TRRAP liée au complexe ne gêne pas l'activité de celui-ci sur la cassure. Nous avons tenté de restaurer l'activité de réparation à l'aide de ces complexes, après immunodéplétion de Mre11 *in vitro* (décrite dans la publication). MRN, autant que TRRAP-MRN semblent inefficaces dans ce cas. Nous expliquons cette inefficacité par la co-déplétion d'autres facteurs de réparation (comme DNAPK, Artemis ou BRCA1), qui auraient été emmenés par l'immunodéplétion en Mre11, et ne sont pas réintroduits.

PARTIE I : DISCUSSION

I. *TRRAP et la réparation DSB*

Nos expériences *in vitro* permettent d'affirmer que TRRAP agit dans le mécanisme de réparation des cassures double brin de l'ADN. L'une des hypothèses les plus évidentes pour expliquer cela serait que TRRAP régule l'expression d'un groupe de gènes impliqués dans la réponse aux DSB. Elle a déjà été indirectement étudiée par le laboratoire des Dr Wang et Herceg (*Herceg et al., 2001 ; Herceg et al., 2003*). En effet, leurs expériences KO sur *trrap*, associées au criblage de puces ADN, permettent d'isoler les gènes dont le niveau d'expression dépend de la protéine. De façon intéressante, les facteurs de réparation déjà connus (détecteurs ou « effecteurs ») ne sont pas nombreux parmi ces gènes. Néanmoins, l'un des gènes surexprimés chez les cellules *trrap*^{-/-} en phase G0 correspond à une sous-unité de l'Origine de Replication (clone AI447692). Un autre, sous-exprimé pendant la mitose, code pour TRp53BP1 (clone AI848686), et enfin un troisième, surexprimé aussi en mitose, code pour *mKu70* (clone AI854574). Notons de plus, il est possible que certains des gènes dérégulés en l'absence de TRRAP soient des acteurs de la réparation non identifiés. Ainsi, TRRAP participe à la régulation de l'expression de certains facteurs de réparation, mais n'apparaît pas aux vues de ces travaux comme un régulateur central de l'expression de ces facteurs. Malgré cela il semble qu'elle soit sur-exprimée dans les lymphocytes d'un individu exposé à un stress génotoxique de type irradiation gamma (*Sakamoto-Hojo et al., 2003*).

Nos expériences *in vitro* montrent que la présence de TRRAP influence la réparation des DSB indépendamment de la régulation de l'expression des gènes (publication 1). En effet, le test de « end joining » réalisé utilise un extrait protéique total, en l'absence du génome et de la machinerie d'expression des protéines. L'effet de TRRAP est probablement direct, et repose sur une interaction avec les facteurs de signalisation ou de réparation sur le site de cassure.

Nous disposons de données réduites sur cette hypothèse, le seul lien direct de TRRAP avec la machinerie de réparation étant MRN. Néanmoins, il est possible d'établir un modèle de fonctionnement de TRRAP par analogie avec son rôle de plateforme dans l'acétylation des histones.

D'autre part, les expériences réalisées et les connaissances déjà disponibles n'excluent pas que TRRAP soit aussi un acteur de la signalisation des DSB, à l'instar d'ATM qui paraît utile à la fois à la réparation et à la signalisation.

a. Par homologie avec la transcription :

TRRAP est un co-facteur central de l'acétylation des histones, et par conséquent un acteur de la régulation de la transcription. Le modèle global de son action (décrit dans la **Figure 13**) varie très certainement en fonction du promoteur et/ou de l'activateur mis en jeu. Cependant, une caractéristique est conservée : TRRAP est recrutée par un « activateur » et induit l'activation de la transcription parce qu'elle ancre des complexes d'acétylation des histones, suivis souvent par des complexes de remodelage dépendant de l'ATP. Peut-on transposer cette caractéristique à la réparation de l'ADN ?

Le qualificatif d'activateur ne s'est pas appliqué aux facteurs de réparation des DSB jusqu'à maintenant. Cependant, MRN en interaction avec TRRAP assume une fonction similaire à celles des activateurs de la transcription. Il lui permet de se trouver à proximité de l'ADN sur un site précis, ce que TRRAP ne peut faire d'elle-même puisqu'elle ne semble pas reconnaître la double hélice. De plus, MRN reconnaît une zone « spécifique » de l'ADN, c'est à dire un simple brin, comme les activateurs de la transcription se lient spécifiquement leurs éléments de reconnaissance. Il pourrait agir à l'encontre de TRRAP comme avec ATM, qui ne se lie à l'ADN endommagé et n'est activée qu'en sa présence (*Lee et Paull, 2005*).

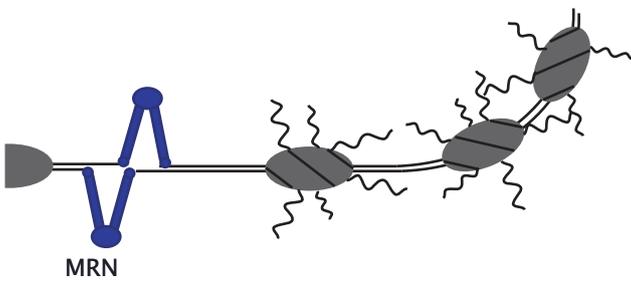
MRN étant considéré comme un « activateur » de la réparation, quels facteurs ou activités sont amenés par l'intermédiaire de TRRAP ? Il y a deux réponses possibles à cette interrogation : par homologie avec la transcription, TRRAP sert de plateforme aux complexes HAT, pour acétyler et assouplir la chromatine autour du site de cassure (hypothèse 1). Néanmoins, TRRAP lié à MRN peut aussi recruter d'autres facteurs de réparation n'ayant pas d'affinité pour l'ADN (hypothèse 2).

i. Hypothèse 1

Dans ce modèle, TFTC et TIP60 pourraient être recrutés sur un site de cassure via TRRAP, qui lui-même reconnaît MRN. Ceci paraît contradictoire avec nos résultats, qui ne montrent pas d'interaction nette, même indirecte, entre MRN et certaines sous-unités de TFTC et TIP60. Par ailleurs, les travaux extensifs du laboratoire du Dr Workman sur ce dernier complexe ne font pas état de la présence de Mre11, Rad50 ou Nbs1 dans leur purification.

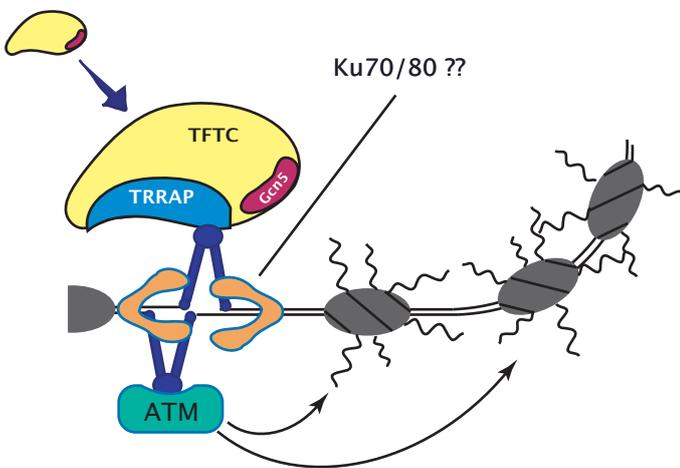
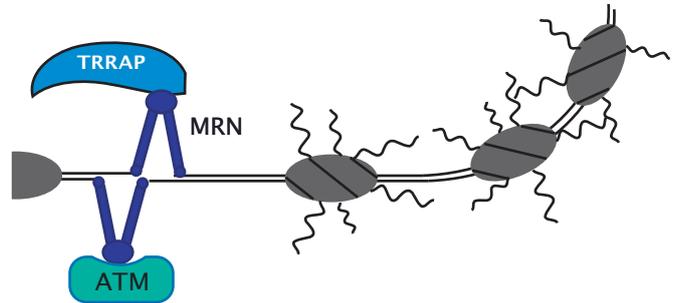
Malgré cela, cette théorie est envisageable si l'on considère une présence très transitoire des « complexes » TIP60 et TFTC sur le site de réparation, tandis que TRRAP y resterait liée plus longtemps, pour faciliter le recrutement séquentiel de l'un et de l'autre. Une autre possibilité est que TRRAP interagisse avec MRN juste le temps nécessaire pour favoriser le recrutement du reste d'un complexe HAT comme NuA4. La présence d'autres facteurs dotés de chromodomains, et bromodomains assure ensuite sa liaison sur la chromatine. Dans les deux cas, ce modèle est concordant avec l'échange rapide d'autres facteurs autour des sites de réparation, comme Nbs1 (*Tauchi et al., 2002*). Il est conforté par la dispersion de TRRAP dans un nombre important de structures multi-protéiques, et la possibilité de son existence isolée dans le milieu cellulaire (voir plus loin).

Enfin, une preuve supplémentaire de la nécessité de complexes HAT de type TFTC ou TIP60 vient des études de sensibilité aux irradiations de différents mutants. Ainsi,

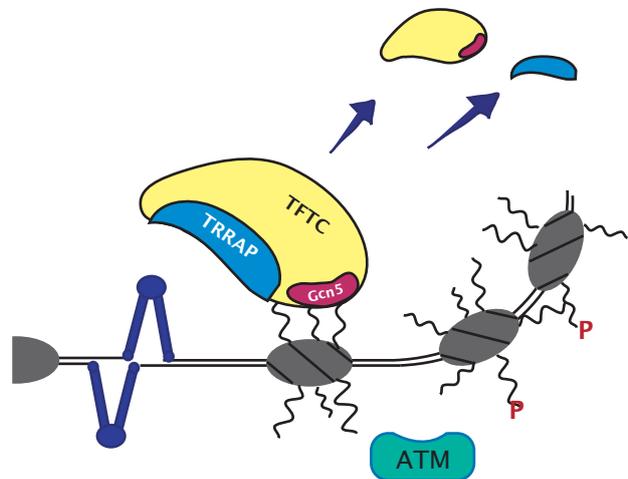


1. MRN est parmi les premiers facteurs recrutés sur l'ADN endommagé.

2. Dès son arrivé, il permet le recrutement d'ATM, qui ne peut sans le complexe se lier à l'ADN. Il est possible que TRRAP soit recruté de la même façon et dans les mêmes délais par MRN.



3. ATM est activée, TRRAP l'est probablement aussi mais par un mécanisme inconnu pour le moment. La seconde peut se lier aux autres sous unités de TFC, par une surface d'interaction différente de celle dédiée à MRN. ATM phosphoryle H2AX autour du site de cassure, et pour cela se détache probablement de MRN.



4 et 5. TFC complété par TRRAP se détache très rapidement de MRN, et vient directement au contact des histones, pour acétyler certains sites et favoriser ainsi l'ouverture de la chromatine. Il est possible qu'après cela TRRAP quitte le site de lésion, pour transmettre le signal de DSB à d'autres machineries, notamment aux points de contrôle du cycle cellulaire.

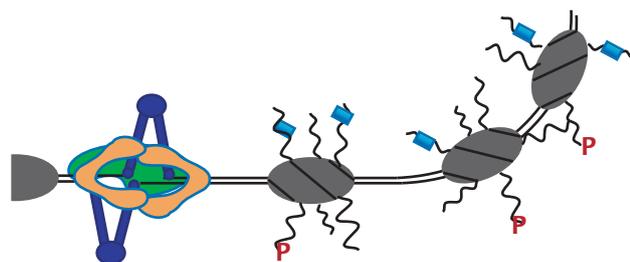
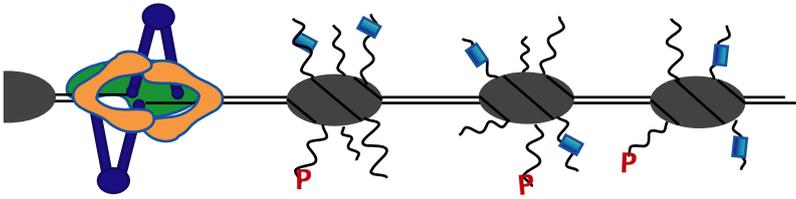
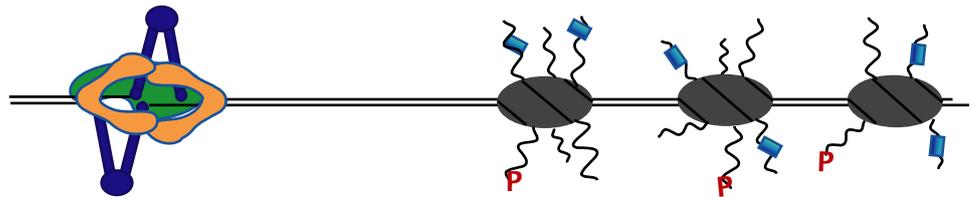
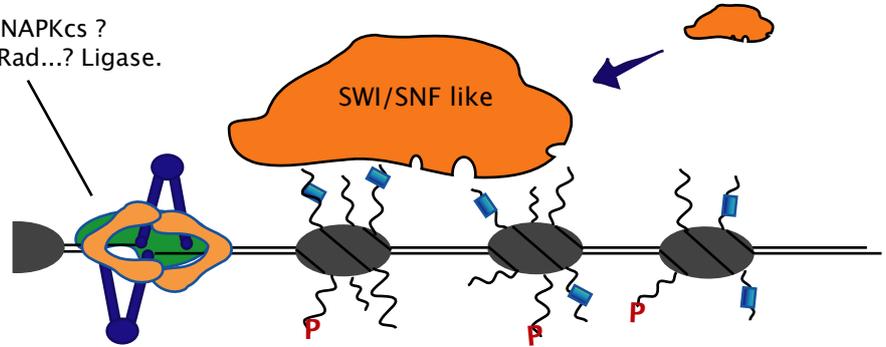


Figure 25A : **Modèle de la participation de TRRAP à la réparation des DSB par l'ouverture de la chromatine.**

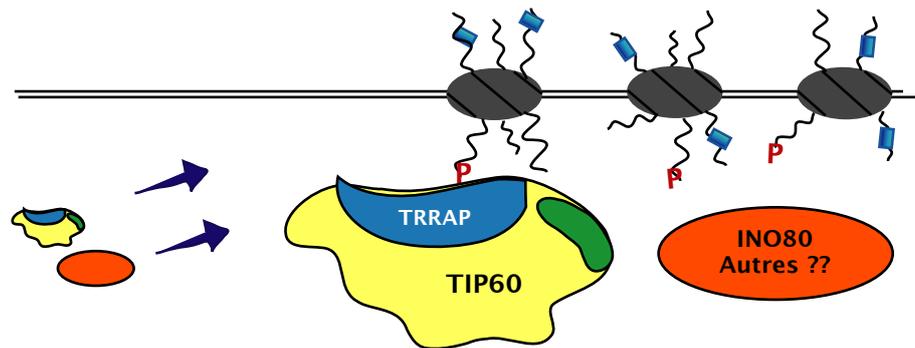


6 et 7. Il est très probable qu'une activité de remodelage dépendante de l'ATP intervienne pour déplacer les nucléosomes à proximité de la cassure. L'ordre d'arrivée des facteurs de réparation et de cette activité n'est pas bien déterminé. Le type d'enzyme ATPase/hélicase dépend peut-être du mécanisme de réparation activé.

Ku ? DNAPKcs ?
RPA ? Rad...? Ligase.



8. La cassure est réparée. C'est à partir de ce moment, que TIP60 et INO80 interviennent, lorsque les histones H2AX phosphorylés ne sont plus nécessaires. Ces deux complexes collaborent pour les remplacer par des histones non phosphorylés. Il est possible que TRRAP participe aussi à cette étape, mais cela est moins probable. En effet, TRRAP n'interagit pas directement avec les extrémités d'histone. De plus, il n'est en contact avec l'ADN que par l'intermédiaire de MRN, qui lui-même semble se lier préférentiellement aux fragments simple brin.



9. La lésion est réparée et la chromatine reprend son état de repos.

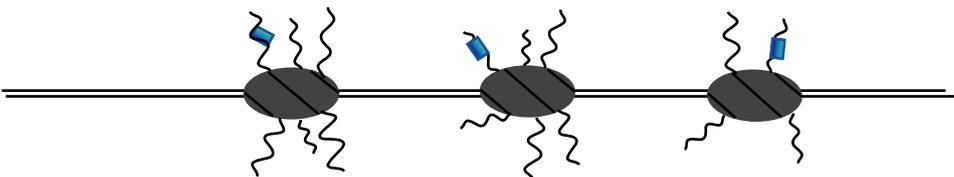


Figure 25b : Modèle de participation de TRRAP à la réparation des DSB par l'ouverture de la chromatine.

des drosophiles dépourvues du facteur Ada2b, qui participe à un complexe HAT, sont anormalement sensibles aux irradiations (*Qi et al., 2004*). Il en est de même pour des cellules *Δesal* ou *Δtip60* (*Bird et al., 2002 ; Ikura et al., 2000*).

Dans ce modèle, on ne peut oublier que le recrutement de complexes de remodelage n'est pas universellement dépendant de TRRAP. La détection de modifications spécifiques par les chromodomains et bromodomains pourrait suffire à amener les complexes sur le site à réparer. Dans le cas de *dmTIP60*, par exemple, la reconnaissance de l'histone variant H2Av phosphorylé pourrait être le facteur déterminant, malgré la présence de TRRAP dans le complexe. Les deux hypothèses de recrutement des complexes de remodelage sur un site de cassure, impliquant TRRAP ou non, sont également probables. Pour distinguer l'une de l'autre ou confirmer leur co-existence, il serait intéressant de localiser les zones précises d'interaction de TRRAP avec MRN et les facteurs de TIP60. Dans le premier cas, en effet, TRRAP ne doit pas gêner l'interaction de MRN avec l'ADN. De la même façon, MRN ne doit pas se placer sur le(s) domaine(s) de recrutement de TIP60. D'autre part, considérant le cas d'un recrutement indépendant de TRRAP, il pourrait être utile de chercher quelles sous-unités dans le complexe TIP60 interagissent avec les histones, et si certaines ont une préférence pour des modifications spécifiques. De même, il faudrait s'interroger sur la capacité de facteurs de complexes Swi/Snf ou BAF à reconnaître H2AX phosphorylé.

ii. Hypothèse 2

TRRAP-MRN peut constituer un site de liaison pour d'autres facteurs de réparation spécifiques, à proximité de la cassure. ATM, qui partage une certaine homologie avec TRRAP, se lie à MRN et change de conformation en même temps que sa fonction kinase devient active. On peut supposer que TRRAP subisse aussi un changement de conformation au contact de MRN, et puisse à partir de là recruter des facteurs de réparation. De façon encore plus similaire à ATM, TRRAP pourrait acquérir une activité kinase par ce changement de conformation au contact de MRN.

De bons candidats d'interaction avec TRRAP pourraient être les facteurs CSR (n° 22, **Figure 21**) et ATRX (n°21, **Figure 21**), qui semblent interagir avec TRRAP. Selon nos résultats MS, leurs fonctions respectives dans la réparation de l'ADN ne sont pas bien définies, du moins dans les banques de protéines. Cependant, elles pourraient être éclaircies si leurs interactions avec TRRAP et MRN sont caractérisées.

Le suppresseur de tumeur Trp53BP1 est aussi un bon candidat. En effet, ce partenaire de p53 est recruté sur les foyers de réparation suite à une irradiation, mais ne se lie pas directement à l'ADN. Il reconnaît la méthylation de la lysine K79 d'H3, rendu accessible par un changement de conformation de la chromatine suite à la lésion de l'ADN (*Huyen et al., 2004*). Certains partenaires de TRRAP dans d'autres complexes contiennent des domaines de reconnaissance des modifications des histones (MRG15 et TRCP120 par exemple).

iii. Modèle

Par soucis de clarté, j'ai préféré présenter la participation de TRRAP-MRN à la réparation des DSB sous forme d'un schéma commenté, basé sur les résultats obtenus au cours de cette étude, et les informations apportées par d'autres travaux (**Figure 25 A et B**)

Ce modèle est par essence limité à un cas particulier de la réparation, du fait que MRN intervient plus spécifiquement en cas de cassure complexe. En effet, selon des résultats très récents (*Jeggo et Lobrich, 2005 ; Riballo et al., 2004*), MRN est nécessaire dans la réparation par NHEJ uniquement pour la religation d'extrémités endommagés complexes (restes de nucléotides dégradés, séquences longues à compléter, fragments simple brins importants...). Nous supposons donc que TRRAP interviennent dans les mêmes cas, et non pas quand les extrémités sont propres, et peuvent être réparées rapidement, sans intervention de MRN.

Afin de vérifier ceci, il serait intéressant de suivre dans le temps la réaction des cellules KO pour *trrap*, aux irradiations gamma. Dans le cas de cellules AT (mutée pour ATM) ou ATLD (mutées pour Mre11), une part minoritaire de foyers est toujours présente longtemps après irradiation, et il est supposé que ces foyers persistants représentent des cassures difficiles à réparer. Si les cellules KO *trrap* ont aussi ces foyers, cela montrera que la protéine participe au même mécanisme qu'ATM, qui est indispensable à la réparation de certaines cassures complexes. Si au contraire, la majorité des foyers persistent, il est possible que TRRAP soit nécessaire à la fin du processus de réparation, c'est à dire le retrait des histones H2AX phosphorylés.

iv. TRRAP et la recombinaison homologue

Les expériences fonctionnelles que nous avons menées dans le but de tester le rôle de TRRAP dans la réparation des DSB concernent principalement la réparation par NHEJ. Les résultats présentés dans la publication jointe montrent que l'absence de TRRAP perturbe ce mécanisme autant *in vivo* qu'*in vitro*. Ceci n'exclue pas que TRRAP soit aussi un facteur utile à la recombinaison homologue. Plusieurs indices vont dans ce sens. D'une part, le phénotype des cellules embryonnaires de souris *trrap*^{-/-} ont un défaut lié à la cohésion des chromosomes durant la mitose. De plus, deux facteurs que nous soupçonnons d'interagir avec TRRAP (Figure 21, N°21 et N° 23) pourraient avoir un lien fonctionnel avec la cohésion des chromosomes. Ces observations sont à mettre en perspective avec l'importance des domaines de cohésion des chromosomes dans la réparation par recombinaison homologue. En effet, la cohésine qui est maintient les chromatides sœurs appariées depuis la réplication jusqu'à la métaphase (*Koshland et Guacci, 2000*), est aussi indispensable au processus HR : elle maintiendrait les deux chromatides appariées sur toute la zone marquée par γ H2AX le temps de la recombinaison (*Unal et al., 2004*).

L'ensemble de ces faits dessine un rôle spécifique de TRRAP dans la recombinaison homologue des DSB. Celui-ci pourrait être de favoriser l'établissement de cette zone de cohésion autour de la cassure, à partir du signal fourni par γ H2AX, et des facteurs de cohésion avec lesquels TRRAP interagit.

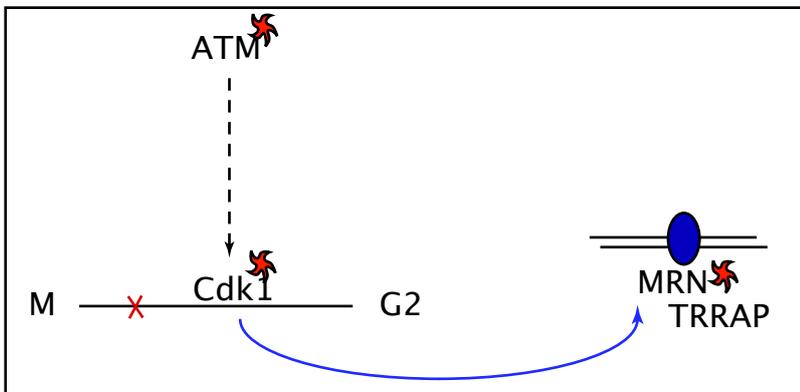
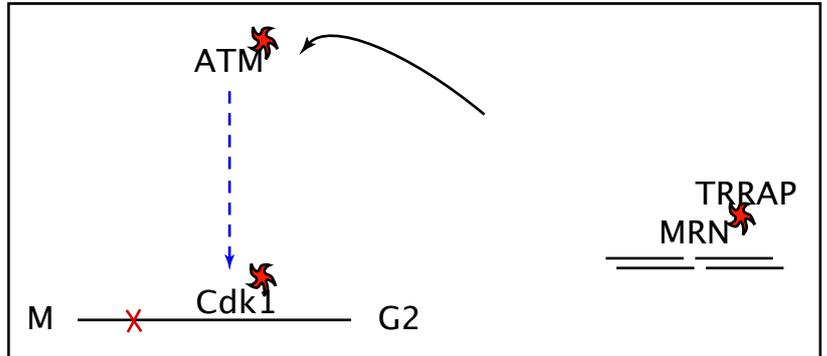
b. Inter-connection avec les points de contrôle du cycle cellulaire :

Le domaine carboxy-terminale de TRRAP est très homologue à celui des kinases de la famille PIKK, dont ATM et ATR font partie. Malgré la mutation du domaine enzymatique chez TRRAP, il est tentant de suggérer qu'elle agisse sur la signalisation des DSB à la façon des PIKK. Nous avons voulu tester cette hypothèse, en observant l'expression de facteurs influencés par ATM, quand TRRAP est inhibée. Après l'inactivation d'environ 50% de la protéine par interférence ARN, nous n'avons pas



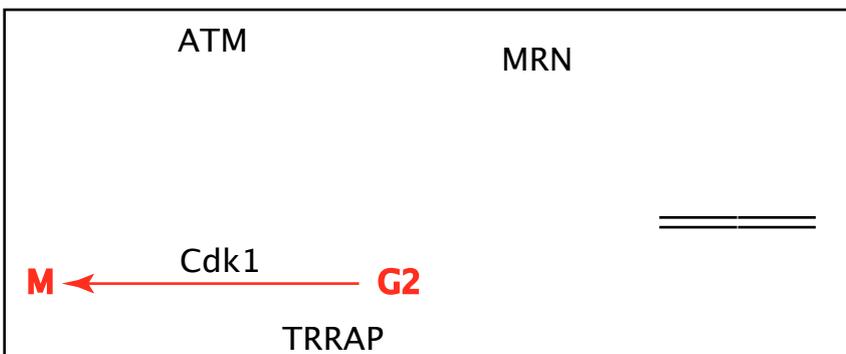
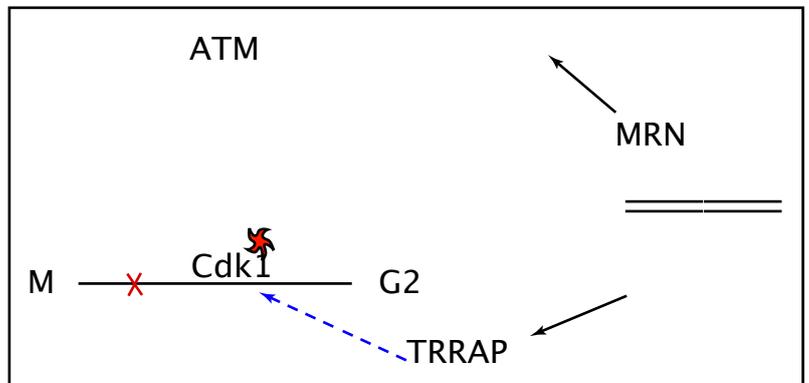
1. Suite au DSB, MRN se lie sur l'ADN avec ATM et/ou TRRAP. Cdk1 est active et permet la transition G2/M.

2. ATM activée déclenche le point de contrôle G2/M, en favorisant le maintien des phosphorylation qui inhibent cdk1.



3. La réparation à lieu avec le recrutement des facteurs nécessaires (cercle bleu). Après un certain temps, Cdk1 favorise le détachement de MRN et TRRAP du site endommagé

4. TRRAP détaché de l'ADN peut participer à lever l'inhibition de Cdk1.



5. L'ADN est réparé, et Cdk1 est déphosphorylée. La transition de G2 vers la mitose peut reprendre.

Figure 26 : Participation de TRRAP à la réparation des DSB par son influence sur le point de contrôle G2/M.

observé de dérégulation nette de la phosphorylation de NBS1, ni d'H2AX, ni d'expression de BRCA1, et p53... TRRAP ne semble pas agir dans la même cascade de kinase qu'ATM.

Néanmoins, les cellules embryonnaires de souris dont les deux allèles de *trrap* sont défectueuses ne suivent pas un cycle cellulaire normal, et cette anomalie s'explique par au moins deux phénomènes. D'une part, les gènes *mad1* et *mad2*, qui régulent le point de contrôle intra-mitotique, ne sont plus activés en l'absence de TRRAP (Li *et al.*, 2004). Par conséquent, la cellule peut finir le processus de mitose sans cytodierèse.

D'autre part, l'activité kinase de Cdk1/Cdc2 est inhibée, et la cycline B2 est mal régulée dans ces cellules (Herceg *et al.*, 2003). Dans une cellule normale, la kinase Cdk1 est l'interrupteur du point de contrôle G2/M déclenché par la présence de cassures double brin. Sa déphosphorylation sur la Thréonine 14 et la Tyrosine 15 rend sa fonction enzymatique active et promeut la transition en mitose. Donc, la réduction de cette activité kinase en l'absence de TRRAP suggère que cette dernière favorise normalement la déphosphorylation, et va donc à l'encontre de l'activation du point de contrôle G2/M. À l'inverse, d'autres membres de la famille PIKK, comme ATM et ATR, sont à l'origine du maintien des phosphorylations de Cdk1/Cdc2, lorsque la présence de DSB en G2 requiert le ralentissement du cycle (Iliakis *et al.*, 2003).

Par ailleurs, il a été observé chez la levure que Cdk1/Cdc2 participe à la réparation des DSB autant qu'à leur signalisation (Ira *et al.*, 2004). En l'absence de Cdk1, Mre11 est recruté sur la cassure mais y reste beaucoup plus longtemps que dans une cellule contrôle. Cette implication de Cdk1 semble spécifique de la réparation des DSB par recombinaison homologue.

Ces observations se complètent, et associée à nos données, permettent de proposer un mécanisme où TRRAP participe à l'inter-connection de la réparation et de la signalisation des DSB (cf. [Figure 26](#)).

Ce modèle peut être décrit de la façon suivante : quand une cassure intervient, MRN est recruté sur la lésion en présence de TRRAP et/ou d'ATM. La seconde est activée par phosphorylation et transmet ce signal via la cascade de phosphorylation jusqu'à Cdk1. Après un laps de temps nécessaire à la réparation, Cdk1 participe à détacher MRN par un mécanisme de communication inconnue. Par là même, TRRAP est libérée de l'ADN maintenant réparé, et vient favoriser la déphosphorylation de Cdk1, pour permettre la transition en mitose. Les deux PIKK ATM et TRRAP équilibrent ainsi leurs actions sur le point de contrôle, à partir du même effecteur MRN.

II. Modularité des complexes multi-protéiques

Nombre des hypothèses formulées jusqu'ici reposent sur une composition très variable des complexes mentionnés. La notion de « complexe » y perd même une partie de son sens, car il devient difficile de définir une limite différenciant une sous-unité stable d'un interactant occasionnel. L'exemple de TRRAP est flagrant, pour deux raisons. D'une part, elle apparaît dans de très nombreux « complexes » impliqués dans divers processus touchant l'ADN. D'autre part, son mode opératoire semble conservé indépendamment des partenaires avec lesquels elle s'associe, du moins pour l'activation de la transcription. En effet, TRRAP est la cible des activateurs qui se lient à l'ADN dans différents complexes.

TRRAP ou Tra1 ont été détectés dans les « complexes » de type SAGA, mais aussi NuA4/TIP60, et p400. Une structure incluant BAF53, Tip48, Tip49 et TRRAP existe probablement, et ce travail montre l'association de TRRAP avec MRN. De plus, la présence de GCN5 avec TRRAP, indépendamment de TFTC/STAGA et TRRAP/MRN (cf. publication, [Figure 1](#)) suggère que tous deux s'associent dans une autre structure pour le moment mal connue.

Par ailleurs, nos purifications de TRRAP/MRN ou de TFTC laissent dans le surnageant une grande portion de TRRAP. Il est difficile de savoir si la purification de complexe NuA4/TIP60 conduit à la même observation, car celle-ci utilise dans la majorité des cas au moins une protéine exogène. Cependant, les premiers travaux sur NuA4 démontrent qu'une IP contre l'enzyme Esa1 endogène laisse dans le surnageant une fraction importante de Tra1 (Allard *et al.*, 1999). Ainsi, il ne semble pas que TRRAP soit majoritairement associée à un groupe de facteurs plutôt qu'à un autre.

La possibilité qu'elle passe d'un complexe à un autre est envisageable. TRRAP pourrait ne s'associer que de façon transitoire, le temps de faciliter une activité enzymatique locale, ou d'assembler plusieurs groupes de facteurs. Sa grande taille autorise en effet que plusieurs protéines se lie à elle de façon concomitante, par des surfaces d'interaction différentes. Il ne faut pas oublier cependant, que cette hypothèse va à l'encontre d'un rôle structural pour TRRAP. À l'heure actuelle, rien ne permet de dire qu'elle soit indispensable à l'organisation des autres facteurs entre eux. Au contraire, un groupe de sous-unités de SAGA est stable sans Tra1 (Wu *et Winston*, 2002). Il serait intéressant pour étudier cette question de purifier les « complexes » SAGA ou NuA4 à partir d'une souche de *S. cerevisiae* KO pour *tra1*.

Notons tout de même que les travaux de Memedula *et al.* décrivent un comportement modulable des complexes *in vivo* (Memedula *et Belmont*, 2003). L'acétylation d'H4 par TIP60, autour d'un promoteur, intervient en effet après l'acétylation d'H3, tandis que TRRAP est toujours présente. Une autre étude suggère que Gcn5 quitte le promoteur après l'acétylation d'H3 (Topalidou *et al.*, 2003). Il est donc possible que les deux enzymes HAT et leurs partenaires respectifs se succèdent sur la plateforme que TRRAP constitue, celle-ci ayant été recruté indépendamment.

La diversité des complexes ATPases et HAT renforce encore cette hypothèse de modularité. En effet, quelques structures dotées d'enzyme HAT ou ATPase de la famille Swi/Snf partagent un groupe commun de facteurs (cf. Figure 11). Ainsi BAF53 ou Arp4, son homologue chez la levure, apparaissent dans 6 complexes différents. Ils sont associés à Tra1 ou TRRAP dans certains cas, à des protéines Swc dans d'autres. Ces facteurs (DMAP1 ou GAS41 pour les homologues humains, par exemple) pourraient se déplacer de TIP60 à SRCAP selon que l'un ou l'autre des complexes doit être actif sur un site donné.

L'étude du comportement dynamique des protéines n'est pas simple, et requiert des moyens importants. En effet, il faudrait pour vérifier ces hypothèses rechercher plusieurs facteurs sur un site de transcription ou de réparation, dans des conditions différentes. La difficulté majeure réside dans le fait d'isoler des différentes étapes d'un processus d'activation de la transcription ou de réparation, qui se déroule normalement de façon continue. Néanmoins, il serait très intéressant de distinguer *in situ*, et séparément, les facteurs présents avec TRRAP lors du déplacement des nucléosomes, de ceux présents lors de l'acétylation des histones. De plus, ces expériences pourraient prendre en compte l'influence du cycle cellulaire sur l'organisation des complexes.

III. Conclusion :

Le but initial de ce travail était d'identifier des partenaires inconnus de TRRAP afin de comprendre le rôle biologique de cette grande protéine. L'analyse par spectrométrie de masse des facteurs qui lui sont liés dans un contexte endogène s'est imposée comme une méthode de choix. Parmi de nombreuses pistes de travail révélées par cette analyse, nous avons choisi d'étudier l'implication de TRRAP dans la réparation des DSB avec le complexe MRN. Les résultats présentés ici prouvent que cette implication est réelle, mais qu'elle ne ressemble pas à la fonction de facteurs de réparation connus. Si TRRAP est partiellement homologue à ATM, elle n'influence apparemment pas les mêmes voies de signalisation. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour préciser ces résultats, notamment à partir de cellules *trrap*^{-/-}.

Les autres partenaires potentiels de TRRAP identifiés par spectrométrie de masse sont tout aussi intéressants que MRN. Ils confirment, d'une part, que cette dernière est un facteur essentiel à la régulation de la transcription par des activateurs. D'autre part, certains pourraient intervenir dans la maintenance de l'intégrité du génome comme MRN, et leur association avec TRRAP demandent à être étudiés plus précisément.

Il serait très intéressant de préciser la place de TRRAP dans la réparation des DSB et leur signalisation aux points de contrôle du cycle cellulaire. Une première approche consisterait à détecter la présence de TRRAP sur un site de cassure, par immunoprécipitation de chromatine (ChIP). Des systèmes permettant d'induire une cassure *in vivo* puis d'observer les facteurs recrutés à cet endroit ont été décrits récemment chez la levure (*Krogan et al., 2004b*), et chez les mammifères (*Golding et al., 2004*). Ils seraient une bonne alternative à l'observation de foyers de réparation par immunofluorescence (IF), puisqu'elle permettrait de distinguer la fraction de TRRAP occupée à la réparation de l'ADN de celle occupée à l'activation de la transcription. En effet, cette fraction nous a probablement empêché d'obtenir un résultat par IF (cf. résultats non publiés, paragraphe II.c). Dans le même but, TRRAP et les sous-unités de MRN pourraient être modifiés pour porter des marqueurs fluorescents (GFP/YFP par exemple) et leur interaction observée *in vivo* par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert). En plus de confirmer l'existence d'une interaction *in vivo*, cette approche déterminerait quelle sous-unité de MRN est en interaction directe avec TRRAP.

D'autre part, les protéines recombinantes, produites dans des cellules d'insectes sont un bon support pour débiter une caractérisation des modifications post-traductionnelles. Il serait intéressant d'identifier les phosphorylations, méthylations et acétylations de TRRAP seule, mais aussi en interaction avec MRN, ou avec l'une des trois sous-unités.

Indépendamment de ces suggestions, une étude pourrait être engagée pour déterminer quels facteurs de réparation interagissent avec TRRAP, parmi ceux que nos analyses par MS ont suggérés (ATRX, CSR et DBC en priorité). Si ces interactions sont confirmées, TRRAP devient un acteur très probable de l'organisation de la chromatine en mitose ou méiose, et de la ségrégation des chromosomes.

Aux vues des nouvelles données, les complexes de régulation de la transcription, et d'organisation de la chromatine apparaissent beaucoup plus instables qu'on ne pensait. Il est très probable que les purifications menées jusqu'ici isolaient des formes majoritaires de ces « complexes », et qu'avec l'affinage des techniques et leur plus grand pouvoir de résolution, certaines sous-unités prennent un caractère facultatif, voire échangeable. Cette capacité des acteurs multiprotéiques à s'adapter au contexte doit aujourd'hui être prise en compte dans les études fonctionnelles et leur interprétation, afin de préciser des modes de régulations mal compris de la transcription autant que de l'organisation de l'ADN en chromatine.

PARTIE II

***ANALYSE DE L'HISTONE H3 SOUS UNE FORME SPECIFIQUE
AUX CHROMOSOMES MITOTIQUES***

I. INTRODUCTION

Cette partie doit être abordée sachant qu'elle présente un travail en collaboration avec Adrien Eberlin, en thèse au laboratoire du Dr L Tora. J'ai pris part à l'étude menée par Adrien dans la mesure où la spectrométrie de masse était utile, et nous avons mis en œuvre ensemble des stratégies basées sur cette technique pour faire avancer notre projet. Je tenterai tout de même de donner une vision complète de cette étude, car nous avons été confronté à une problématique originale qui nécessite d'être expliquée.

Notre étude s'enracine dans une thématique récente en biologie moléculaire, le « code histone ». Cette théorie tente d'expliquer des phénomènes de régulation de l'expression génique que le schéma classique de transcription et de traduction des gènes ne suffit pas à justifier. Les paragraphes ci-dessous sont destinée à introduire cette thématique très riche et très évolutive, sans prétendre à l'exhaustivité. En effet, notre projet porte sur l'organisation particulière de l'ADN durant la mitose, et concerne particulièrement les méthylations des histones. Après la description des acteurs et des hypothèses du code histone et leur illustration par quelques exemples, je restreindrai donc cette introduction aux connaissances acquises sur les modifications post-traductionnelles spécifiques de la mitose.

a. Modification des queues amino-terminales des histones

- i. Les queues amino-terminales d'histone sont des cibles privilégiées d'interaction et de modification.

Lors de la cristallisation d'un mono-nucléosome, il est apparu que les queues amino-terminales des histones dépassent de la structure cylindrique formée par leurs parties carboxy-terminales et la double boucle d'ADN, et ne prennent pas de conformation préférentielle dans l'espace (*Luger et al., 1997*). De plus, elles ne sont pas directement impliquées dans les interactions ADN-proteines qui font la solidité du nucléosome, ni dans l'organisation de la fibre de 11 nm, qui est le premier niveau de compaction de la chromatine. Cependant, elles offrent une large surface d'interaction avec l'extérieur, comptant pour 25 à 30% de la masse de chaque histone. Ceci explique leur participation aux niveaux d'organisation supérieurs, qui s'appuient sur des interactions entre nucléosomes même distants (*Hansen et al., 1998*). Ces extrémités protubérantes peuvent aussi interagir avec les très nombreuses enzymes de modification covalente des protéines, qui sont connues depuis longtemps pour réguler au moins la transcription de l'ADN. Ainsi, c'est en 1964 qu'Allfrey et al. ont démontré le lien existant entre l'hyperacétylation des histones et l'activation de la transcription (*Allfrey et al., 1964*). Depuis, de nombreuses modifications ont petit à petit été découvertes sur les queues d'histones et impliquées dans la régulation locale et/ou globale de processus touchant l'ADN (pour une revue assez exhaustive (*Peterson et Laniel, 2004*)). Pour ne donner qu'un exemple, il a été observé *in vitro* que la présence de 6 lysines acétylées par octamère désorganisait complètement le repliement de la chromatine, et suffisait à activer la transcription d'un système reconstitué (*Tse et al., 1998*). Une synthèse des modifications caractérisées par des moyens analytiques et biochimiques est donnée par la **Figure 27**.

Ces modifications sur des résidus précis et conservés n'apparaissent pas au hasard. Elles ont chacune des conséquences spécifiques sur les processus liés à l'ADN (transcription, réparation, réplication). Au milieu des années 1990, ces observations ont établi les bases d'une hypothèse fondamentale de la biochimie, le « code histone ».

ii. Types de modifications et motifs de reconnaissance

1. De nombreux résidus modifiables :

Les extrémités amino-terminales des Histones H2A, H2B, H3 et H4 sont riches en sites de phosphorylation, acétylation, et méthylation. De plus, d'autres modifications covalentes ont été décrites plus récemment : des ubiquitinations, des sumoylations, des glycosylations et des ADP-ribosylations. Certaines se situent même dans la partie de cœur des histones. Ainsi, la lysine 79 d'H3 est exposée à la surface de l'octamère, et peut être méthylée malgré sa position dans le corps de l'histone (Ng *et al.*, 2002). La **Figure 27** représente les modifications connues et dont l'existence a été confirmée *in vivo*. Notons que de nombreuses autres modifications, notamment dans le domaine de cœur des histones, ont été détectées par spectrométrie de masse, mais n'ont pas encore été étudiées en détail.

2. Domaines reconnaissant les modifications des histones

Certains motifs appelés Bromodomaines, Chromodomaines, ou motifs SANT semblent spécifiques des facteurs de transcription, des enzymes de remodelage et de leurs partenaires. Un ensemble de travaux montrent aujourd'hui qu'ils reconnaissent des sites spécifiques des queues d'histones, et facilitent ainsi le recrutement de ces facteurs sur la chromatine (pour des revues (Boyer *et al.*, 2004 ; Brehm *et al.*, 2004 ; Zeng *et Zhou*, 2002)). Leur fonction commune peut être définie comme le couplage de la reconnaissance spécifique des histones avec une activité enzymatique.

Le motif SANT (identifiés chez Swi3, Ada2, N-coR, TFIIB) est le plus fréquent de ces motifs chez les facteurs de remodelage de la chromatine (Aasland *et al.*, 1996). Il couvre 50 à 60 acides aminés, qui s'organisent en 3 hélices α de la même façon qu'un domaine de liaison à l'ADN (Boyer *et al.*, 2004). À la différence des Bromodomaines et Chromodomaines, le domaine SANT semble spécifique des extrémités amino-terminales d'histones non modifiées (Boyer *et al.*, 2002). Il est considéré comme un auxiliaire des Bromodomaines et Chromodomaines, qui eux reconnaissent des modifications spécifiques. En effet, sa présence facilite l'ancrage de la protéine sur une histone, qu'une modification ait été reconnue ou non par un des motifs sus-cités.

Les Bromodomaines ont une séquence consensus d'environ 80 acides aminés, et doivent leur nom à l'ATPase de drosophile Brahma. Ils ont été caractérisés récemment pour leur capacité à complexer les lysines acétylées. Leurs séquences sont variables, et cette variabilité fait la spécificité de chacun pour une Lysine par rapport aux autres (Agalioti *et al.*, 2002 ; Hassan *et al.*, 2002). L'homologue humain de Brahma, *hsBrg1*, et le co-activateur de TBP *hsTAF1*, contiennent respectivement 1 et 2 Bromodomaines.

De la même façon, le Chromodomaine (« CHRomatine Organisation MODifier ») est caractéristique de protéines liées à la chromatine, comme HP1 et Polycomb, les premiers facteurs chez qui il fut détecté. Sa structure comprend 3 feuillets β et une hélice α qui forment une cavité pouvant accueillir une lysine méthylée dans sa conformation la plus étendue (Ball *et al.*, 1997). De façon étonnante, les Chromodomaines de Mi-2 et MOF chez *D. melanogaster* reconnaissent aussi des fragments d'ADN et d'ARN qui semblent importants pour leurs fonctions HAT respectives (Akhtar *et al.*, 2000 ; Bouazoune *et al.*, 2002).

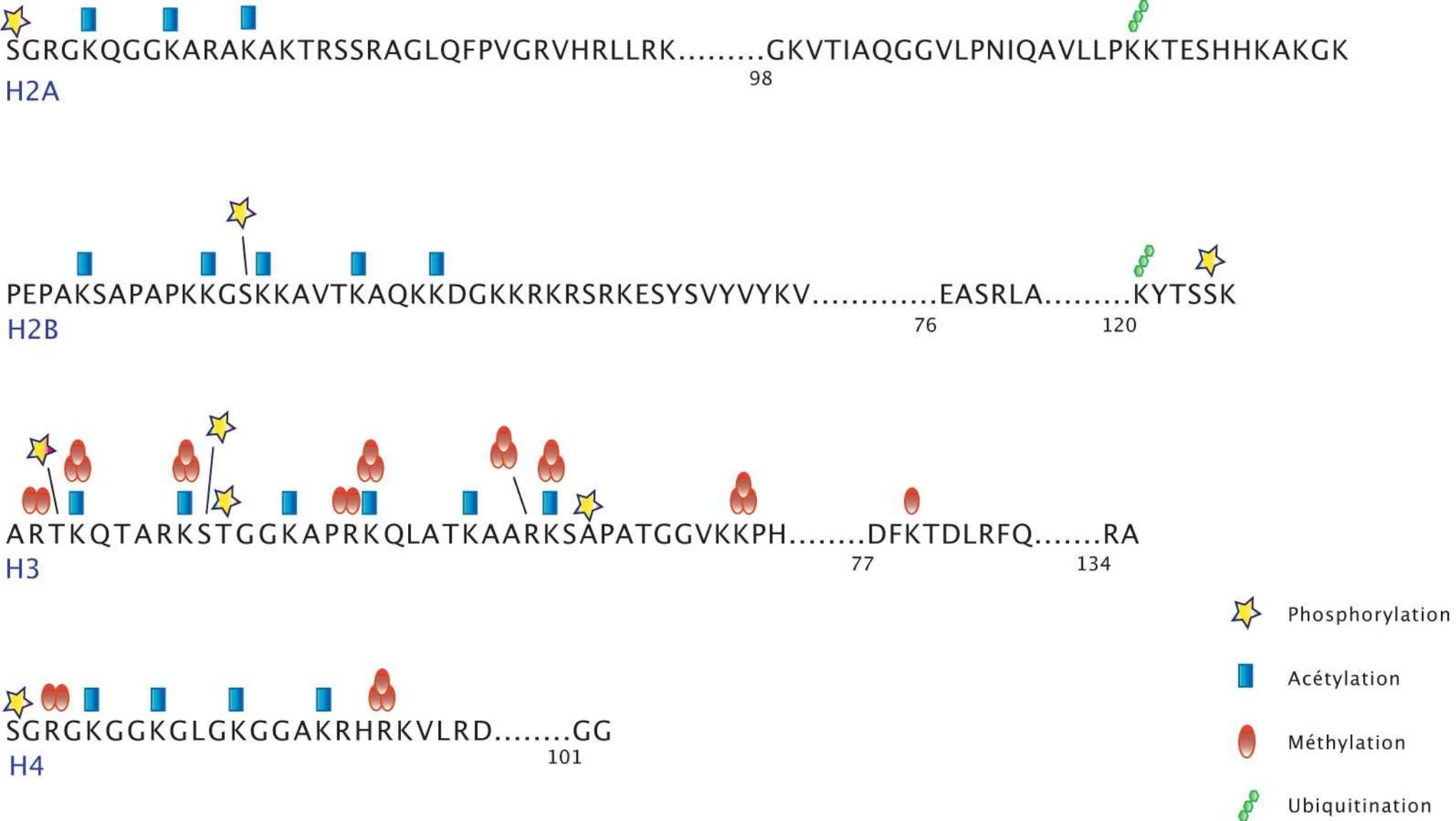


Figure 27 : **Représentation schématique des modifications covalentes des histones identifiées in vivo.**

Les quatre histones du nucléosome sont représentées par leur séquence d'aa, tronquée aux endroits figurés par des pointillés. Les nombres sous chaque séquence correspondent au numéro du 1er aa après les pointillés. Les symboles des différentes modifications sont représentés à droite de la figure. Plusieurs ovales rouges figurent une méthylation éventuellement multiple sur une même lysine.

b. Le code histone : dialogue entre modifications via les co-facteurs de la transcription.

i. Les hypothèses :

La théorie du code histone s'appuie sur quelques hypothèses résumant les nombreuses observations faites depuis une dizaine d'années :

- Une combinaison de modifications des histones à un endroit du génome dicte l'état de la chromatine et régule ainsi les mécanismes cellulaires liées à l'ADN, dans cette région.
- Ces modifications sont interdépendantes (*Strahl et Allis, 2000*).
- Elles communiquent entre elles et avec ces processus via des facteurs qui les reconnaissent spécifiquement, dans ce qu'on pourrait qualifier de « transduction du code histone » (*de la Cruz et al., 2005*)

De façon concrète, les facteurs généraux de la transcription, les enzymes de remodelage et leurs co-facteurs, ainsi que les protéines liées à la chromatine contiennent fréquemment l'un des domaines décrits ci-dessus. Ils reconnaissent donc les histones modifiés, et coordonnent ainsi leurs actions respectives. Certains ajoutent une modification, d'autres déplacent les nucléosomes. Ils constituent des ponts de communication entre différentes modifications, et forment un ensemble d'effecteurs du code histone illustré ci-dessous.

ii. Communication en cis et trans entre les modifications

Une modification peut influencer l'établissement d'une autre sur le même polypeptide, ou sur un polypeptide distant.

Communication en Cis :

De façon non surprenante, l'acétylation de la Lysine K9 d'H3, et la phosphorylation de la Sérine voisine S10 empêchent la méthylation en K9, ce qui peut être expliqué par des incompatibilités chimiques et stériques (*Rea et al., 2000 ; Zhang et Reinberg, 2001*).

De façon plus inattendue, les méthylation sur les lysines K4 et K9 d'H3, des résidus plus distants, ne sont pas compatibles : Il a été montré que la méthylation en position K9 n'est pas possible *in vitro* sur un peptide déjà méthylé sur K4. D'autre part, le recrutement sur la chromatine du complexe NuRD (histone dé-acétylase, ou HDAC), qui reconnaît la lysine K9 méthylée, est inhibé par la présence d'une méthylation en K4 (*Zegerman et al., 2002*). Cette incompatibilité se retrouve dans les effets connus de ces deux modifications, puisque la méthylation en K9 décrit un état réprimé de la chromatine, tandis que l'activation de la transcription est liée à la méthylation d'H3 en K4.

L'observation de ces interdépendances a créé le besoin de compléter la théorie du code histone par celle d'un fonctionnement par « paires » ou par « cassettes » des résidus modifiables sur les histones. Ceux-ci sont regroupés sur une courte séquence (quelques acides aminés), comprennent souvent des motifs conservés, et les modifications qu'ils portent s'influencent, pour réguler de façon commune certains signaux (*Fischle et al., 2003*). La lysine K9 et la Sérine S10 d'H3 sont un exemple, mais leur coopération a été remise en cause récemment (*Mateescu et al., 2004*).

Communication en Trans :

De façon encore plus marquante, certaines coopérations s'établissent entre des modifications portées par des histones différents, qu'ils participent ou non au même nucléosome. Par exemple, la

méthylation sur l'histone H3 et l'ubiquitination d'H2B sont interdépendantes. L'ubiquitinylation en position K123 d'H2B est une modification rare dans tout le génome (5% environ des histones). Malgré cela, elle est nécessaire à la méthylation massive des histones H3 en position K4 et K79. En effet la délétion du gène *rad6*, codant pour une ligase d'ubiquityle chez la levure, ou la substitution de la Lysine K123 entraîne une diminution importante de la quantité de méthylation sur H3 *in vivo* (Sun et Allis, 2002).

iii. L'initiation de la transcription et le code histone.

Comme il a été mentionné plusieurs fois jusqu'ici, certaines modifications des extrémités des histones autour d'un promoteur activent fortement l'initiation de la transcription à partir de ce promoteur. En particulier, les acétylations d'H3 et H4, respectivement par Gcn5 et Tip60p, sont primordiales. Ces modifications neutralisent la charge positive du groupement amine latéral des lysines, ce qui diminue la force des interactions entre nucléosomes adjacents, et celles des queues d'histone avec l'ADN intermédiaire (Sims *et al.*, 2003). Cependant, elles ne sont pas suffisantes pour rendre l'ADN accessible à la machinerie de transcription ou de réparation ce qui nécessite le déplacement des octamères sur la chaîne d'ADN pour libérer un promoteur, ou un site endommagé. Des complexes de remodelage dépendant de l'ATP doivent donc intervenir en supplément. Il est intéressant de noter que leur recrutement peut être facilité par la présence d'une modification spécifique sur les histones environnant.

Les acétylations et méthylation sont reconnues séquentiellement par des facteurs de remodelage et de transcription, qui sont riches en Chromodomaines et Bromodomaines (Hassan *et al.*, 2002). Dans une étude récente, Agaloti *et al.* montrent que l'acétylation de la Lysine 8 d'H4 permet le recrutement du complexe de remodelage SWI/SNF (Agaloti *et al.*, 2000). Puis, l'ajout d'une acétylation sur la lysine K9 d'H3 offre une surface d'interaction au double bromodomaine de TAF1 et ancre TFIID sur le promoteur. Néanmoins, ce processus et les facteurs qu'il implique sont particuliers au promoteur IFN- β sur lequel l'expérience a été menée. Une toute autre combinaison de modifications est possible pour activer un autre promoteur. De façon concordante, les facteurs de remodelage, les GTFs et les complexes HAT sont recrutés selon des ordres et des combinaisons spécifiques à différents promoteurs (Cosma *et al.*, 1999 ; Cosma, 2002)

Dans l'initiation de la transcription, Il est alors difficile de qualifier de « code histone », ce qui paraît être un ensemble de processus distincts, localisés et activés pour une courte période par des stimuli très spécifiques.

iv. La mémoire cellulaire et le code histone.

L'état réprimé d'un gène peut être transitoire, s'il est utile à la cellule pour répondre à un signal, ou à long terme si ce gène est spécifiquement exprimé dans un autre type cellulaire, ou d'un stade particulier du développement de l'organisme (comme les gènes maîtres). Dans le premier cas, les modifications d'histones sont probablement très variables d'un gène à l'autre et d'une cellule à l'autre. En revanche, le second cas sous-entend la transmission de cet état réprimé ou actif à la descendance de la cellule. En particulier, les cellules spécialisées doivent reproduire le même programme transcriptionnel que leur cellule mère. Les mécanismes de transmission qui soutiennent cette mémoire cellulaire ne sont pas bien connus, mais les données actuelles indiquent que les modifications post-traductionnelles y participent. L'exemple le plus étudié est l'organisation de l'hétérochromatine orchestrée par la méthylation de K9 sur H3 (pour une revue (Turner, 2002)).

La condensation partielle du génome en hétérochromatine repose sur la reconnaissance par HP1 (Heterochromatin Protein 1) de méthylations multiples sur la Lysine K9 d'H3 (Bannister *et al.*, 2001 ; Jacobs et Khorasanizadeh, 2002 ; Nakayama *et al.*, 2001). HP1 organise la structure répressive de la chromatine par le recrutement d'HDACs et d'ARNs non codant (Maison *et al.*, 2002 ; Muchardt *et al.*, 2002). Cependant, H3 K9 diméthylée doit être liée à la fois à HP1 et à la méthyltransférase SUV39H1 pour générer l'hétérochromatine (Stewart *et al.*, 2005 ; Yamamoto et Sonoda, 2003). De façon indépendante, cette diméthylation est capable d'inhiber la transcription en empêchant l'acétylation autour d'elle. Ce comportement correspond donc bien à l'expression d'un code histone qui est interprété par les facteurs de transcription et de remodelage de la chromatine.

La réplication de l'ADN à chaque division cellulaire ne doit pas remettre en cause la répression de larges portions du génome par l'hétérochromatine. Le mode opératoire de cette transmission, comprenant la conservation de l'état de méthylation des H3 K9, n'est pas bien compris à ce jour. Il pourrait être lié à la transmission des méthylations de l'ADN lors de la réplication. Cette autre marque épigénétique sur les dinucléotides CpG est caractéristique de la formation d'hétérochromatine « facultative » loin des centromères, quand un locus ou une région doivent être inhibés. Ainsi, une récente étude propose que les méthylations des îlots CpG et de l'histone H3 soient transmises de façon coordonnée, lors de la réplication par un complexe spécifique CAF1 (Chromatin Assembly Factor 1). Celui-ci assemble les nouveaux nucléosomes, son partenaire MBD1 reconnaît les méthylations des CpG introduites par DNMT1 (DNA methyltransferase 1) en interaction avec PCNA, et enfin l'histone méthyltransferase SETDB1 reproduit les méthylations sur les nouvelles histones (Sarraf et Stancheva, 2004).

Une théorie largement admise suppose que la transmission de la mémoire cellulaire incombe uniquement aux méthylations des histones, car celles-ci sont significativement plus stables que d'autres modifications. Il a été montré que certaines peuvent être maintenues sur un gène de l'euchromatine réprimé au cours de plusieurs mitoses, et ainsi à travers des générations successives (Ayyanathan *et al.*, 2003). Mais, les méthylations sont tout de même labiles, et disparaissent. Récemment, une enzyme capable de retirer une méthylation d'H3 K4 de façon spécifique et régulée a été identifiée (Shi *et al.*, 2004). D'autre part, elles n'expliquent pas la transmission de l'état actif de certains gènes d'une génération à l'autre.

v. Un rôle pour les acétylations dans la mémoire cellulaire ?

Une vision d'ensemble des travaux portant sur les modifications d'histones dessine une répartition bipolaire des rôles : les acétylations permettent l'ouverture de la chromatine au niveau local, tandis que les méthylations agissent sur l'ensemble du génome, assurant la condensation de larges domaines et la transmission d'informations épigénétiques à travers les générations. Mais cette séparation pourrait être moins nette qu'il y paraît.

Il est vrai que l'acétylation des histones par sa nature chimique décondense les nucléosomes, et est en général liée à une plus grande accessibilité du site. Mais cet effet peut s'étendre sur un promoteur, sur une région ou à l'échelle d'un chromosome, de la même façon que l'hétérochromatine. Ainsi la compensation de dosage du chromosome X des individus mâles chez *D. melanogaster* passe par une acétylation élevée de la lysine K16 de l'histone H4 par l'HAT MOF, sur l'ensemble du chromosome (Akhtar et Becker, 2000 ; Kuroda et Kelley, 1999). D'autre part, si le niveau d'acétylation globale des cellules d'eucaryotes supérieurs est faible, les sites activés pour la transcription de gènes essentiels ou spécifiques au type cellulaire sont caractérisés par de larges domaines acétylés. Ces domaines couvrent plus que la région nécessaire à la transcription, et semblent définir non pas uniquement la zone chromatinienne activement transcrite, mais un domaine de chromatine réceptif à la transcription. Ils ne se trouvent jamais à proximité de l'hétérochromatine (Schubeler *et al.*, 2000).

Même si les preuves mécanistiques manquent, ces observations montrent que l'acétylation des histones a, comme la méthylation, une implication dans la régulation de l'accessibilité globale du génome.

La transmission des acétylations est probable mais doit suivre un mécanisme très particulier. Néanmoins, un état globalement acétylé des chromosomes gêne l'entrée en mitose : il a été montré chez les plantes au moins, qu'une déacétylation globale est nécessaire en début de mitose (*Li et al., 2005*). Des travaux concordants démontrent qu'une hyperacétylation des histones durant la mitose est néfaste à la fonction du centromère et à la ségrégation des chromosomes. Il semble que méthylation et acétylation soient inversement régulée au cours du cycle cellulaire, et une forte méthylation durant la mitose s'oppose à une forte acétylation pendant l'interphase (*Rice et al., 2002*). En début de mitose, la chromatine s'organise dans une conformation qui empêche l'accès des HAT et HDAC aux queues d'histones, malgré que ces enzymes restent actives (*Kruhlak et al., 2001*). Certaines acétylations résiduelles et localisées peuvent donc subsister, et favoriser la réactivation de promoteurs après la division cellulaire.

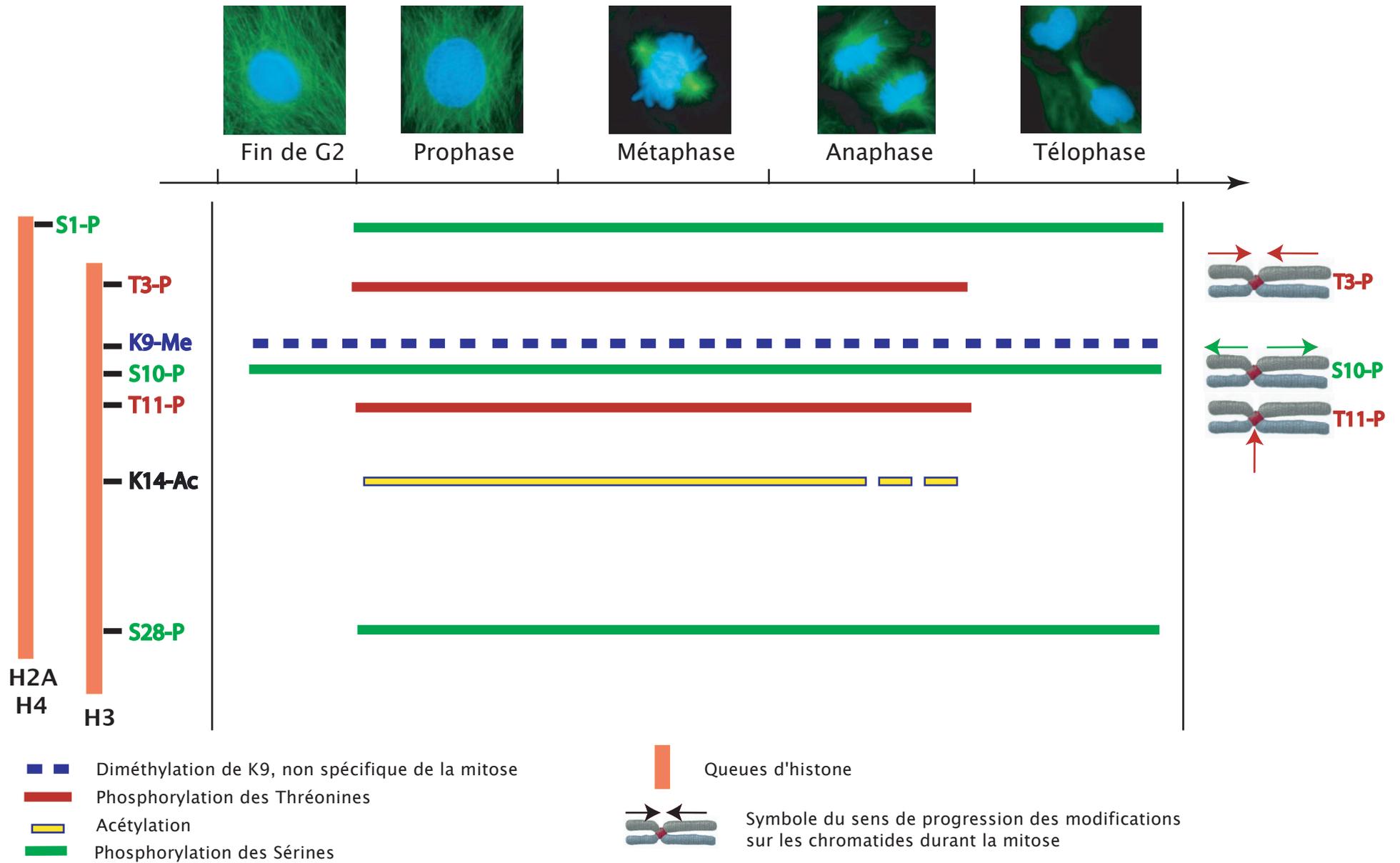


Figure 28 : **Modifications des queues d'histones spécifiques des chromosomes mitotiques.**

Les différentes modifications représentées à gauche apparaissent et disparaissent au fonction des stades de la mitose représentés en haut. Leur localisation et leur progression sur les chromatides au cours de la mitose est donnée à droite quand elle est connue.

c. Le code histone durant la mitose

La transition cruciale que subit la cellule de la phase G2 à la mitose, et en particulier la condensation des chromosomes, sont des processus encore très mystérieux. Une désorganisation et une réorganisation complètes de la chromatine interviennent, dans lesquelles les modifications portées par les histones ne peuvent qu'être impliquées. La présence de méthylations et phosphorylations spécifiques dans les chromosomes mitotiques a été bien documentées, mais leurs rôles et leur interdépendance font toujours l'objet de controverse (Figure 28).

Les histones H3 sont massivement phosphorylés en S10 durant la mitose et la méiose (Gurley et al., 1978). Cette phosphorylation était considérée dans une première série de travaux, comme un moyen de détacher HP1 de l'hétérochromatine pour introduire à sa place les protéines de condensation spécifique de la mitose. En effet, la phosphorylation de S10 et la méthylation de K9 ne semblaient pas compatibles (Rea et al., 2000). Cette observation a permis de supposer que la séquence d'acides aminés autour de K9 et S10 formait un commutateur binaire, une « cassette » fonctionnelle participant au code histone (Fischle et al., 2003). Selon ce modèle, l'occurrence d'une phosphorylation sur S10 ferait disparaître d'une façon ou d'une autre la méthylation de K9 pour déstabiliser HP1 et autoriser la condensation des chromosomes.

Cependant, la preuve a été faite récemment que la méthylation de K9 et la phosphorylation de S10 peuvent cohabiter sur un même histone (Mateescu et al., 2004). Il faut l'apparition d'une acétylation supplémentaire sur K14 pour libérer HP1. Si l'on en croit ces travaux, la double méthylation de K9 est persistante, avec la phosphorylation de S10 durant la mitose.

La sérine 10 d'H3 est phosphorylée par la kinase spécifique de la mitose Aurora B (Pascreau et al., 2003), qui a aussi pour substrat la Sérine 28 (Goto et al., 2002). Cette autre phosphorylation est détectée sur les chromosomes mitotiques (Goto et al., 1999). Elle apparaît cependant plus tardivement que la phosphorylation de la Sérine 10, c'est à dire en début de prophase et non en fin de phase G2 (Mateescu et al., 2004) (Figure 28). Pour finir, les Thréonines 3 et 11 d'H3 sont aussi spécifiquement phosphorylées pendant la mitose chez les mammifères (Polioudaki et al., 2004 ; Preuss et al., 2003). Elles ne sont pas détectables en fin de G2 à l'inverse de la phosphorylation sur S10, et disparaissent avant la fin de l'anaphase. Pour confirmer que ces 3 modifications ne participent pas au même processus durant la condensation et la ségrégation des chromosomes, il a été observé que la phosphorylation de T11 est limitée aux alentours des centromères, tandis que la phosphorylation de T3 progressent des télomères vers les régions péri-centromériques au cours de la mitose. La phosphorylation de S10 se propage elle sur les chromatides du centromère vers les télomères (Hendzel et al., 1997)

H3 n'est pas le seul histone modifié spécifiquement lors de la condensation des chromosomes. Les Sérines initiales d'H2A et H4, qui ont les mêmes 5 premiers acides aminés conservés chez de nombreuses espèces, sont aussi phosphorylées. Leur modification suit au cours de la mitose la même évolution que celle de la Sérine 28 d'H3 (Barber et al., 2004). Enfin, l'histone pontant H1 est phosphorylé sur 5 positions précises durant la mitose, mais il ne paraît pas indispensable au bon déroulement de la division cellulaire (Dasso et al., 1994).

Ainsi, la mitose se distingue des autres étapes du cycle cellulaire par l'apparition massive de modifications spécifiques des histones, parmi lesquelles les phosphorylations sont majoritaires. Le rôle de chacune n'est pas connu, même si certaines comme H3 S10 ne sont pas indispensables à la condensation en chromosome (de la Barre et al., 2001).

Par ailleurs, le rôle des méthylations et phosphorylations pendant la mitose est beaucoup mieux connu que celui des acétylations. Le devenir de ces dernières pourrait cependant susciter l'intérêt car elles marquent globalement les gènes actifs, qui pourraient être à nouveau transcrits après la division cellulaire. Finalement, la fonction de vecteur de la mémoire cellulaire semble revenir aux méthylations et phosphorylations, mais les acétylations ont très probablement un rôle à jouer.

IV. RESULTATS

a. Historique du projet :

Récemment, une observation très étonnante a été faite dans notre laboratoire. L'un de nos anticorps originellement destiné à reconnaître une forme méthylée de *hsTAF10*, ne reconnaissait pas cette protéine sur une membrane de WB, malgré l'existence prouvée par spectrométrie de masse de la forme modifiée de TAF10. En revanche, son application sur des cellules humaines donnait un résultat intéressant en immunofluorescence.

Sur une population de cellules HeLa ou NIH3T3 (fibroblastes de souris) en croissance exponentielle, cet anticorps, nommé « 2H12 » et issu de cellules de souris, se lie spécifiquement aux cellules mitotiques (Figure 29). De plus, son signal est localisé sur les chromosomes, les couvrant totalement et spécifiquement. Il apparaît en fin de phase G2 avec le début de la condensation, et disparaît en sortie de mitose avec la décondensation. L'anticorps reconnaît donc un facteur spécifique des chromosomes mitotiques, qui disparaît ou n'est plus accessible hors de la mitose. Notons que le signal en l'immunofluorescence de 2H12 différait de celui des marqueurs déjà connus de la mitose, comme la phosphorylation de la Sérine 10 d'H3 (Figure 29). La séquence des chromosomes était recouverte entièrement de la prophase à l'anaphase ce qui n'est pas le cas avec un anticorps dirigé contre H3 phosphorylé en Sérine 10.

Compte tenu de la spécificité de cet anticorps, et du fait que la condensation des chromosomes durant la mitose reste un phénomène très mystérieux, nous avons voulu savoir quel était l'épitope reconnu de façon inattendu *in vivo*.

b. Identification de l'histone H3 comme antigène de l'anticorps 2H12

Adrien a tout d'abord réalisé une immunoprécipitation d'extrait nucléaire de cellules humaines avec l'anticorps 2H12, afin d'isoler les facteurs portant l'épitope, et les partenaires de ceux-ci. Les protéines séparées par électrophorèse ont été digérées dans le gel par une protéase et les peptides obtenus furent soumis à une analyse d'empreinte peptidique par le Dr Manuela Argentini (pour un mode opératoire illustrant cette analyse cf. Matériels et Méthodes). Les résultats de cette analyse comprenaient les histones H3 et H2A, parmi d'autres candidats. Ceci concordait avec la liaison de l'anticorps aux chromosomes, mais ne suffit pas à expliquer sa spécificité pour les chromosomes mitotiques.

La seconde étape a consisté à vérifier la reconnaissance d'H3 par 2H12 à partir d'histones humains purifiés. Un mélange d'histones enrichi par purification en milieu acide sur une colonne d'hydroxyapatite, a été soumis à une IP anti-2H12. L'histone H3 et son partenaire d'hétérodimérisation H4 ont été retenus spécifiquement par la résine d'IP.

De par l'origine de l'anticorps, nous soupçonnions la présence d'une modification d'H3 ou H4 qui fasse sa spécificité pour les chromosomes en mitose. En effet, il est

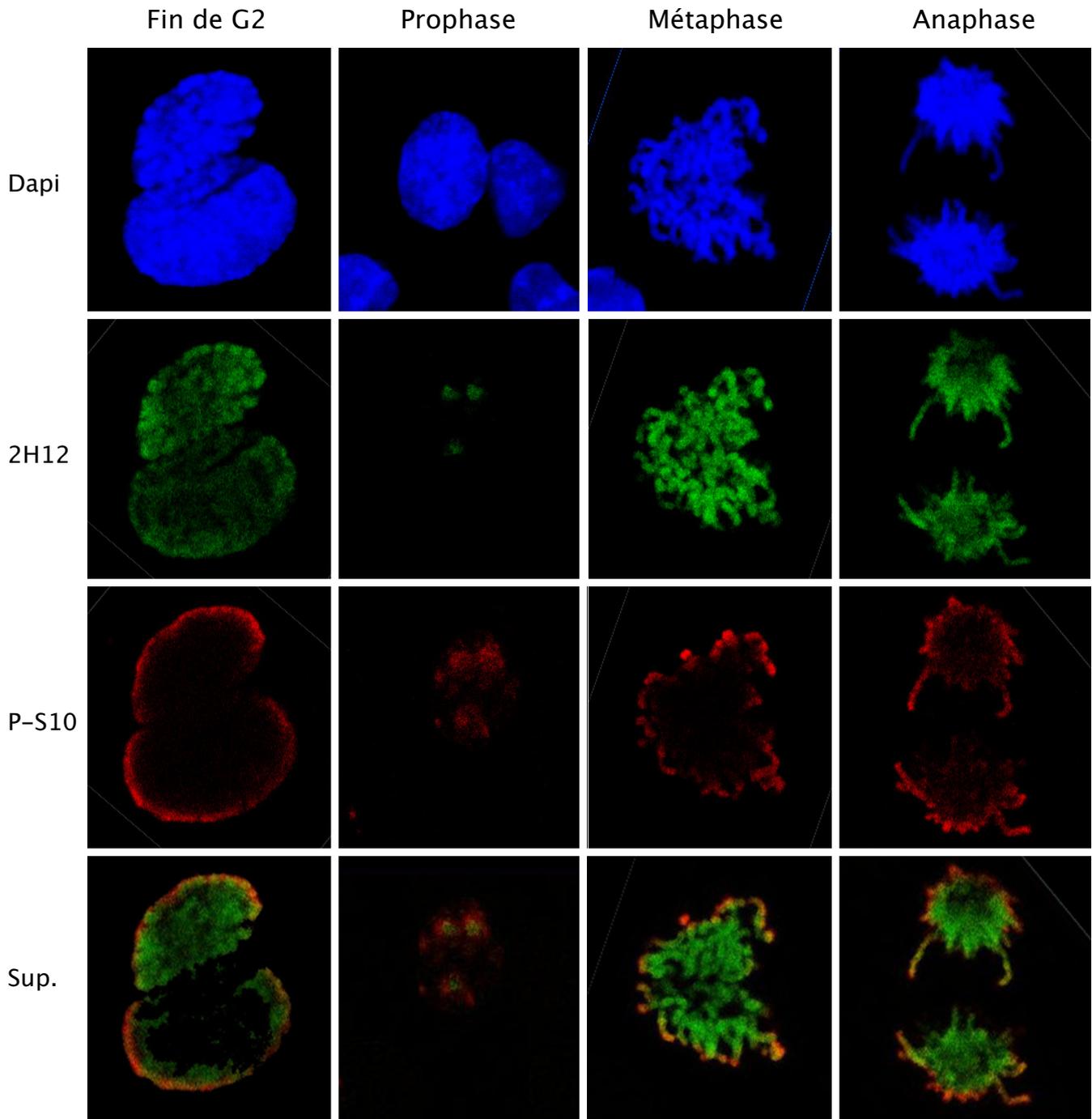


Figure 29 : **Marquage par l'anticorps 2H12 de cellules COS mitotiques observées par immunofluorescence.**

4 stades de progression en mitose sont montrés de gauche à droite. La coloration bleue est due au Dapi, spécifique de l'ADN. En vert, le signal correspondant à l'anticorps 2H12, et en rouge celui d'un anti-H3 Sérine 10 phosphorylée, marqueur connu de la mitose. La dernière ligne est une superposition des colorations par 2H12 et H3 PhosphoS10.

connu que l'état de modification des queues amino-terminales des histones change avec le cycle cellulaire. Nous avons donc réalisé l'immunoprécipitation précédente sur une histone H3 de *X. laevis* surexprimé chez la bactérie *E. coli*, et normalement dépourvu de modification post-traductionnelle. L'histone H3 d'origine bactérienne n'était pas reconnue par l'anticorps. La spécificité de 2H12 dépend donc de la présence d'une modification sur l'histone H3 ou H4.

c. Analyse par spectrométrie de masse simple

Mon travail dans cette étude a consisté à identifier la modification sur H3 reconnue par l'anticorps 2H12. Il a fallu pour cela purifier une quantité importante de cette forme modifiée, et la digérer par une protéase pour mesurer précisément la masse des peptides obtenus. La digestion en solution aurait été une solution avantageuse, car elle limite les pertes quantitatives et qualitatives de peptides. Malheureusement, nous n'avons pu détacher l'histone H3 liée à l'anticorps sans l'endommager, afin de la digérer sans l'anticorps. En effet, la compétition avec le peptide synthétique de TAF10 n'est pas efficace, ce qui n'est pas une surprise aux vues du peu d'affinité de 2H12 pour cette épitope dans la protéine TAF10. D'autre part, une élution de la résine portant l'anticorps et l'histone par saut de pH demande *a posteriori* de dialyser l'échantillon récupéré, ce qui entraîne une dégradation des modifications, et une perte de matériel. Nous avons donc séparé les histones des chaînes d'anticorps sur un gel de polyacrylamide. Après coloration du gel, les peptides ont été digérés dans le gel pour former des peptides qui ont été analysés par MALDI-TOF MS.

Une autre difficulté technique est apparue à ce stade de la préparation de l'échantillon : les histones sont des protéines très basiques, par leur teneur élevée en Lysines et Arginines. Ils se lient très fortement au colorant Coomassie R250 que nous utilisons pour la détection visuelle des protéines dans le gel d'acrylamide. À la différence d'autres protéines, les histones ne relarguent pas le colorant au cours des différents lavages qui précèdent la digestion enzymatique. Celui-ci est retrouvé avec les peptides à analyser et perturbe fortement le spectre de masse. Ainsi, nous avons dû utiliser une technique de coloration alternative, qui se base sur la formation d'un précipité blanc de Zinc et d'imidazole, au endroit du gel ne contenant pas de protéine (selon la méthode de (Hardy et Castellanos-Serra, 2004), cf. Matériels et Méthodes). Un exemple de gel coloré est donné par la [Figure 30](#).

Afin de localiser la modification reconnue par 2H12, plusieurs échantillons ont été analysés de la même manière : l'histone H3 purifiée de cellules HeLa (In), l'histone H3 exprimé chez *E. coli* (contrôle, noté H3 bact.), le surnageant de l'IP-2H12 (SN), et la résine de cette même IP (IP-2H12). Les bandes de gel correspondant à H3 ont été excisées et soumises après lavage à une digestion enzymatique dans le gel. Après plusieurs essais, la protéase Arg-C a été préférée à la trypsine, car elle ne découpe les peptides qu'après chaque résidu Arginine. La trypsine, qui fait de même après les Lysines et les Arginines, transforme les queues des histones en peptides trop petits pour la gamme de détection du MALDI-TOF. Les peptides de digestion par Arg-C extraits du gel ont été analysés pour les 4 échantillons décrits ci-dessus dans les mêmes conditions.

L'alignement des différents spectres obtenus permet de distinguer les peptides modifiés et enrichis spécifiquement par l'IP-2H12, en appliquant plusieurs règles :

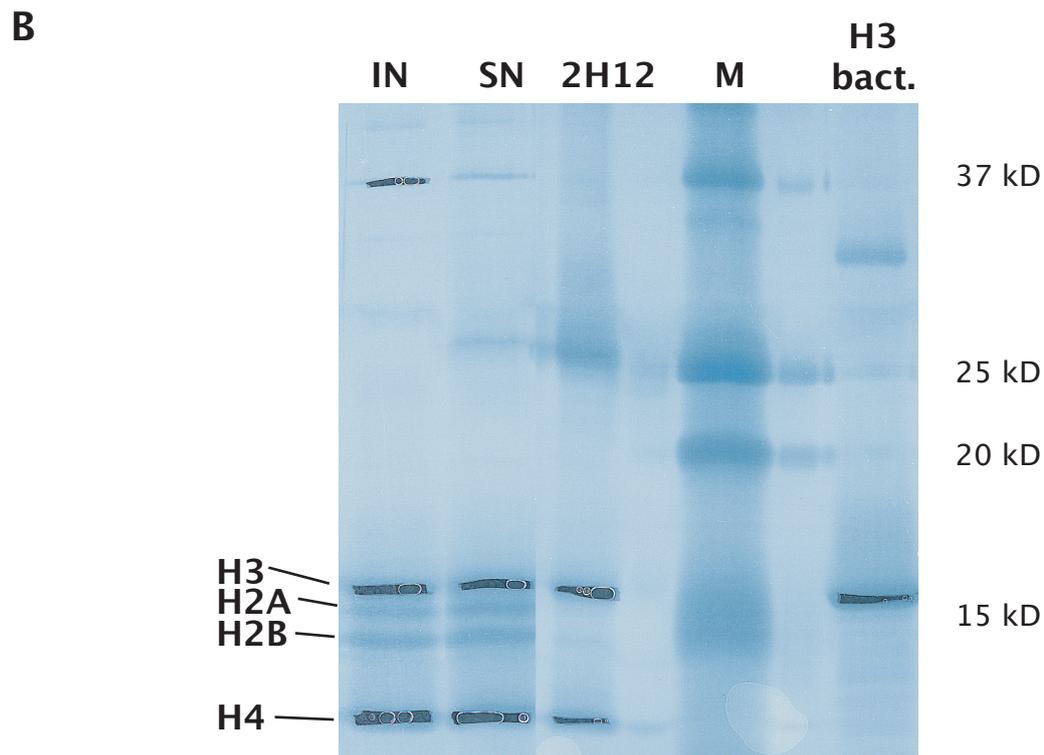
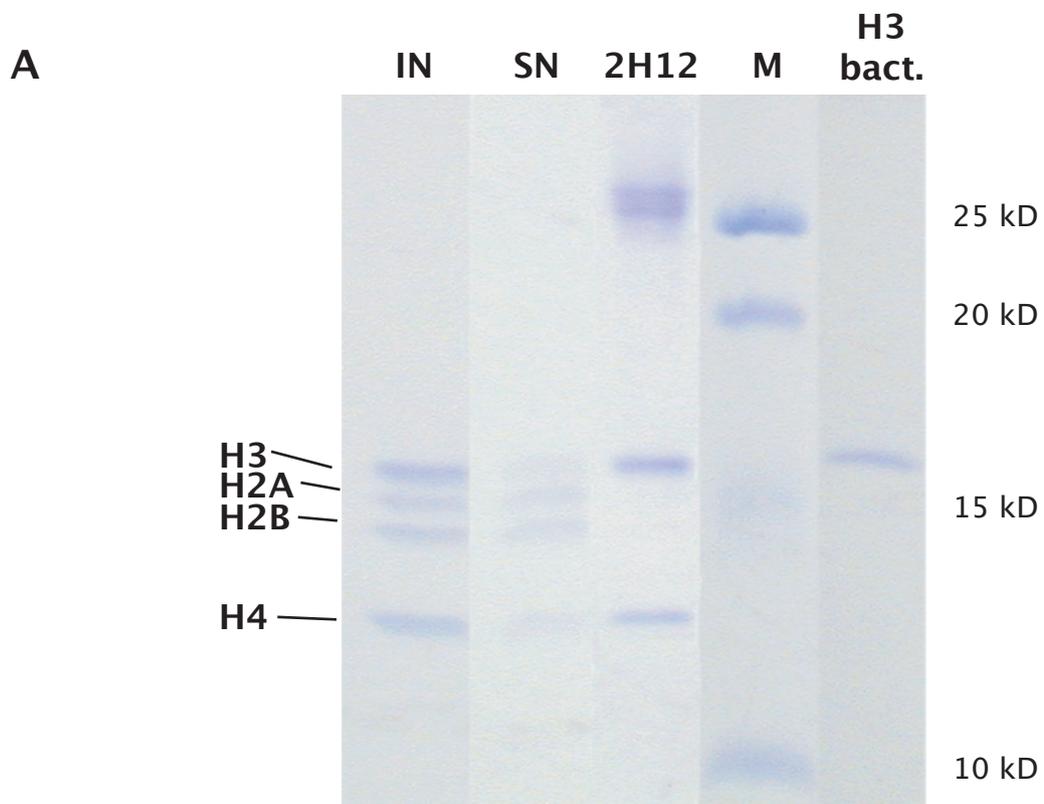


Figure 30 : Gels préparatifs de séparation d'histones par IP-2H12.

A : coloration au bleu Comassie colloïdal. **B** : coloration négative Imidazole-Zinc

De gauche à droite, la première piste contient la préparation d'histones (In), la seconde, surnageant d'IP (Sn), la troisième la résine d'IP (2H12), la quatrième des marqueurs de poids moléculaire (M), et la dernière la préparation d'H3 issu de bactérie (H3 bact.). Les poids moléculaires approximatifs sont donnés à droite, et la position des histones à gauche de la figure. Les espaces noirs correspondent à des bandes de protéines excisées avant la prise de vue.

d'une part, le pic de ce peptide doit être absent de l'échantillon H3-bact, qui en théorie de contient pas d'histone modifié. D'autre part, son intensité par rapport au pic du même peptide non modifié doit diminuer de l'IN au SN. Enfin, cette même intensité doit augmenter dans l'échantillon Ip-2H12 par rapport aux IN et SN. Une seule masse correspondant à un peptide d'H3 répondait à ces critères.

La masse 929,5 Da correspond au peptide 9-KTSGGKAPR-17 d'H3, doublement méthylé. La **Figure 31** montre que cette masse est absente du spectre correspondant à l'histone recombinant, mais présente dans IN et le surnageant, mais avec une intensité relative moindre que dans l'IP2H12 (comparer avec l'intensité de la masse du peptide non modifié, 901,5 Da). Le peptide correspondant à cette masse est donc spécifiquement enrichi par l'IP-2H12.

Ce résultat a été confirmé par plusieurs analyses indépendantes par spectrométrie de masse, mais aussi par des tests d'interaction et de compétition *in vitro* avec des peptides synthétiques (réalisés par Adrien Eberlin).

Comme on peut le voir sur la **Figure 30**, l'histone H4 est aussi partiellement retenu par l'anticorps 2H12. Cependant, ce même anticorps ne reconnaît pas H4 résolu sur un gel d'acrylamide et transféré par WB sur une membrane. Nous supposons donc que la présence d'H4 dans l'IP-2H12 résultait de sa forte interaction avec H3. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons soumis H4 au même protocole d'analyse par spectrométrie de masse qu'H3. La comparaison des spectres n'a pas permis d'isoler un peptide spécifiquement enrichi par l'IP-2H12.

Ce résultat est très intéressant, mais incomplet : La double méthylation détectée peut être portée par la Lysine 9, par la Lysine 14 ou par l'Arginine 17 du peptide, et l'analyse MALDI ne permet pas de distinguer ces trois possibilités. Une autre hypothèse est que chaque Lysine, ou une Lysine et une Arginine, porte une méthylation. Il faut obtenir la séquence en acides aminés du peptide modifié *in vivo* pour localiser les modifications. Nous nous sommes alors tournés vers la spectrométrie de masse tandem.

d. Analyse par spectrométrie de masse tandem

Cette technique consiste à apporter une énergie importante à l'ion-peptide afin de casser les liaisons peptidiques entre acides aminés. Celles-ci sont plus instables que les liaisons C-C ou C-O qui soutendent le reste de la chaîne peptidique. La mesure des masses obtenues et des différences les séparants permet d'obtenir la séquence d'acides aminés. Si l'un d'eux est modifié de façon covalente, la différence de masse qui en résulte est visible dans la plupart des cas.

En premier lieu, nous avons analysé le peptide endogène de masse 929,5 Da par fragmentation d'ions métastables, dans un appareil MALDI-TOF-TOF (cf. Matériels et Méthodes). Le spectre obtenu (fig XXX, « ?? ») représente une partie du profil de fragmentation attendu pour la séquence KSTGGKAPR. Les ions de type b et y sont nettement présents. Cependant, ce spectre ne permet pas de positionner les méthylation sur la séquence. Il exclut l'hypothèse d'une répartition des méthylation sur les deux Lysines. En effet, aucun ion correspondant à la fragmentation de K(Me)STGGK(Me)APR n'apparaît dans ce spectre (cf. schéma de fragmentations théoriques en **Annexe 1**). De même, aucun ion ne pourrait appartenir à un peptide

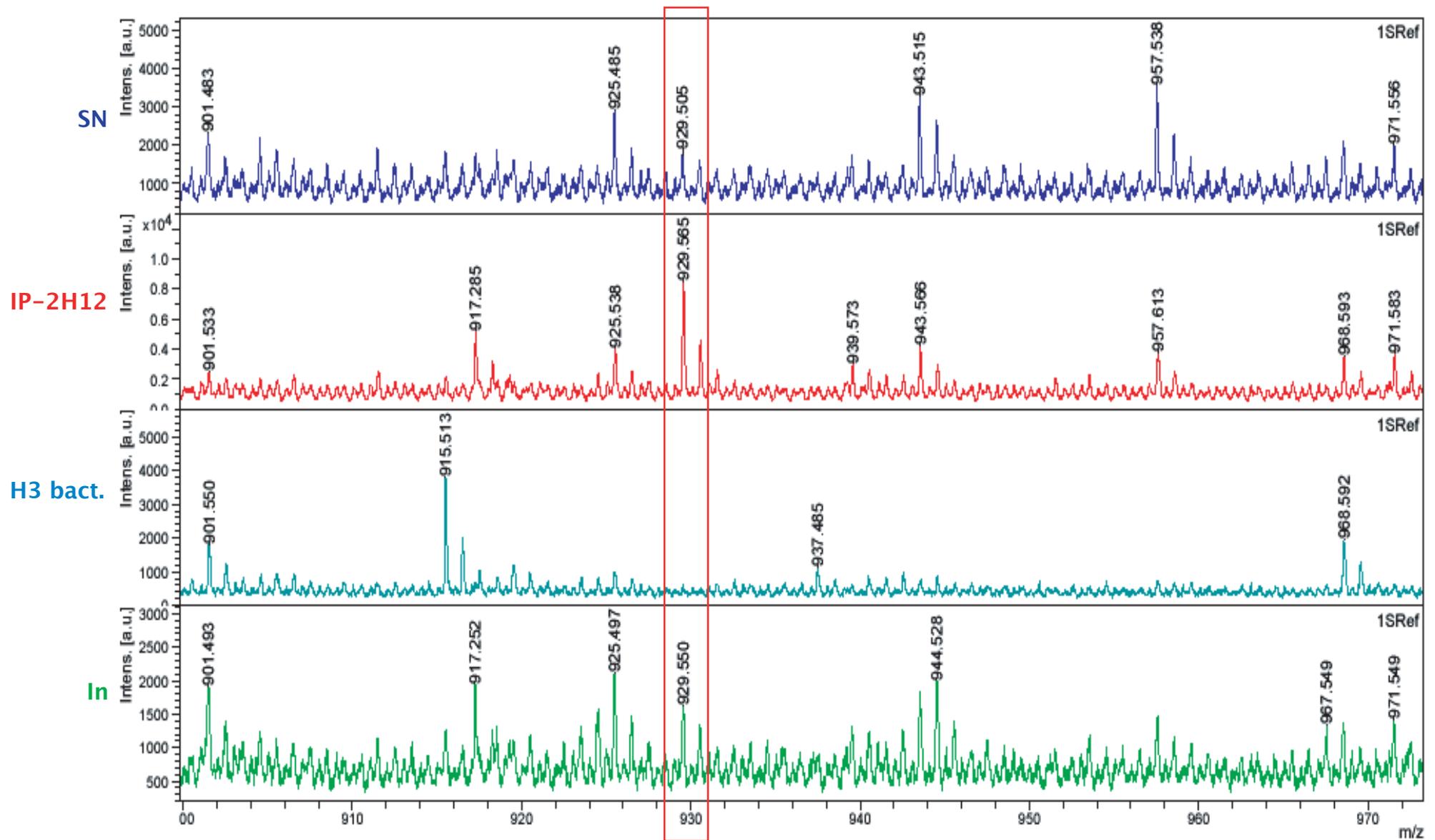


Figure 31 : Spectres MS de H3 issus des échantillons d'Ip2H12 sur des histones purifiés.

Les spectres acquis sur un appareil MALDI-TOF sont alignés sur la même échelle m/z, de haut en bas : H3 issu du surnageant d'IP (SN), H3 issu de la résine d'IP (IP-2H12), H3 contrôlé sur-exprimé chez *E. coli* (H3 bact.) et H3 issu du mélange d'histones purifiés utilisé pour l'IP (In). La masse 929,5 Da correspondant au peptide 9-KSTGGKAPR-17 doublement méthylé est encadrée en rouge. Le même peptide sans modification apparaît à 901,5 Da.

méthylé ou doublement méthylé sur l'Arginine 17. Cependant, des masses intenses comme le pic à 128,8 Da, peuvent provenir d'une séquence portant une double méthylation en K9 autant qu'en K14.

Cette masse est particulièrement intéressante dans notre étude car il ne s'agit pas d'un produit de fragmentation habituel. Dans le cas où la double méthylation serait portée par la Lysine 14, cette masse correspond sans surprise au fragment b, c'est à dire la Lysine seule non méthylée. Mais dans l'autre cas, il peut correspondre au fragment a. Celui-ci résulterait d'une coupure avant la liaison peptidique, donc serait dépourvu d'un atome de carbone et d'un atome d'oxygène par rapport au fragment b (cf. principe de fragmentation des peptides en [Annexe 2](#)). Le CO en moins se traduit par une différence de masse de 28 Da, soit exactement la masse de deux méthylation portées par la chaîne latérale de la Lysine. Finalement, une Lysine non méthylée donne un fragment de type b, de la même masse que le fragment a d'une Lysine doublement méthylée ! Dans une fragmentation typique, les fragments b sont majoritaires, mais cela ne semble pas être le cas du spectre que nous avons obtenu.

Une autre stratégie consistait à modéliser la fragmentation du peptide endogène à l'aide de peptides synthétiques. Nous avons fait synthétiser deux peptides de séquences KSTGGKAPR, l'un portant une double méthylation sur la première Lysine (nommé PH81), l'autre sur la seconde (nommé PH82). Chacun a été soumis à une analyse de fragmentation dans les mêmes conditions que le peptide endogène. Les trois spectres obtenus sont présentés dans la [Figure 32](#).

Au premier abord, les fragmentations de PH82 (A) et de PH81 (B) sont peu différentes. Les masses obtenues majoritairement sont les mêmes et correspondent à des fragments qui ne dépendent pas de la position des Lysines (fragments y1, y2, y3, b6 et b7 par exemple). La comparaison avec le spectre du peptide endogène permet tout de même de favoriser une hypothèse. Le fragment b5 du peptide PH81 (B), à la masse 458 Da, est présent dans le spectre central, mais absent de celui de PH82 (A). Par ailleurs, des masses correspondant à des fragments complexes non assignés (notés avec des X rouges dans la [Figure 32](#)) de PH82 et PH81 montrent que le spectre endogène ressemble plus au second qu'au premier. Une masse à 475 Da en particulier n'apparaît que dans les spectres de PH81 et du peptide endogène. Enfin, le fragment complexe a7 identifié pour PH82 est absent du spectre de ce dernier.

Cet ensemble d'observations suggère fortement que le peptide d'H3 que nous avons isolé avec l'anticorps 2H12 est doublement méthylé sur la Lysine K9. Cette suggestion nécessite une confirmation qui pourrait être obtenue par d'autres techniques d'analyse par spectrométrie de masse, comme proposé au paragraphe suivant.

Les expériences biochimiques sur des histones purifiés et des peptides synthétiques ont confirmé l'affinité de l'anticorps 2H12 pour le peptide KSTGGKAPR diméthylé sur la Lysine K9. Mais elles n'excluent pas la participation d'autres modifications à cette affinité ([Figure 33](#)). Ainsi avec Adrien Eberlin, nous avons observés que l'anticorps 2H12 reconnaît sur une membrane un peptide d'H3 pourvu que celui-ci porte une double méthylation sur K9. Ce n'est pas le cas pour la diméthylation sur K14. Nous avons comparé ces résultats aux comportements de deux autres anticorps spécifiques. L'anticorps dirigé contre une double modification (Diméthyl-K9, Phospho-S10) de l'équipe du Dr Muchardt est un marqueur de la mitose (*Mateescu et al., 2004*). Dans nos expériences, il reconnaît sans distinction un peptide phospho-S10, d'un autre

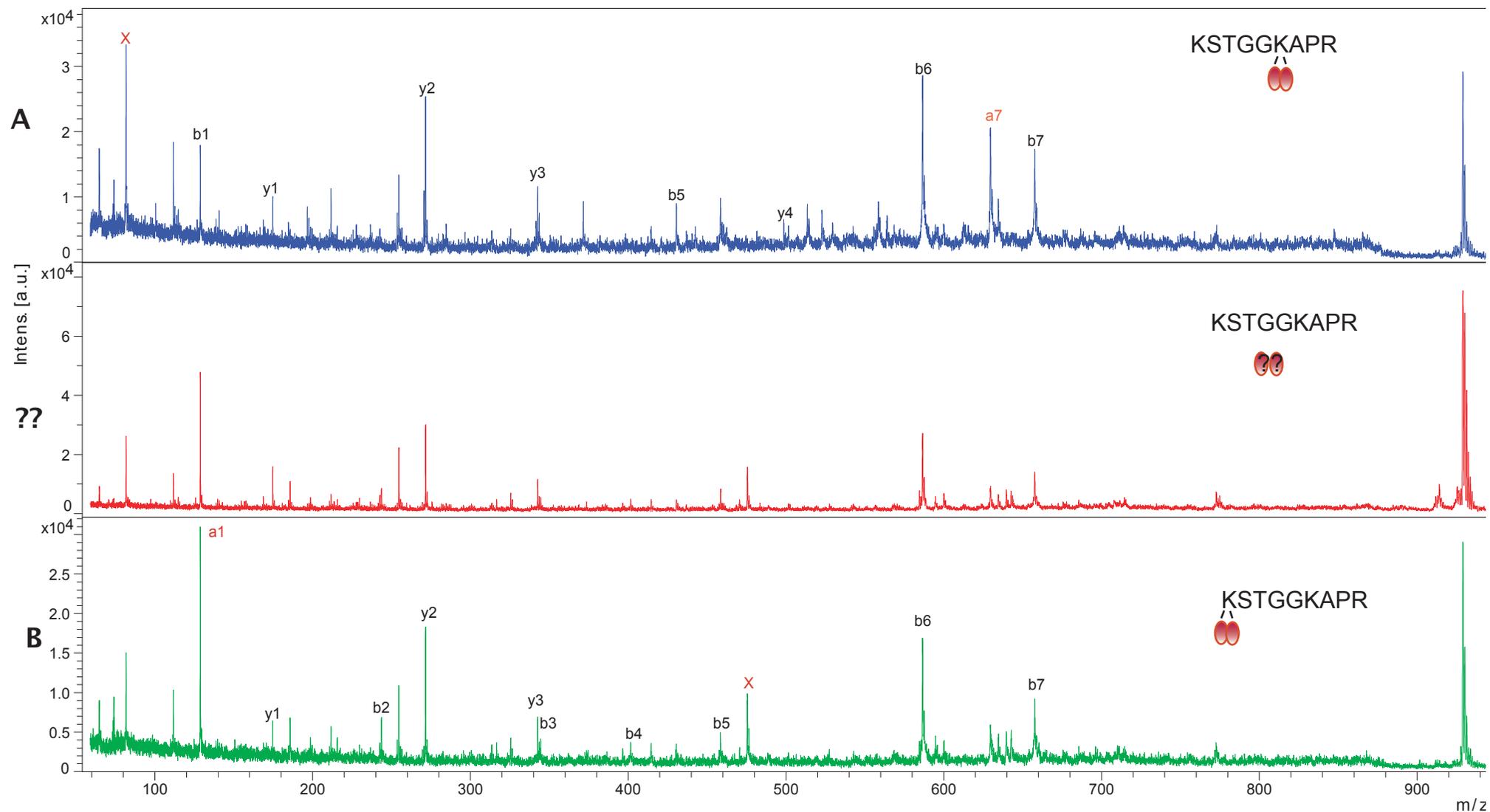


Figure 32 : Analyse par MS tandem de la séquence du peptide à 929, 5 Da issu de H3, et de deux peptides synthétiques modèles.

A : profil de fragmentation du peptide KSTGGKAPR portant une double méthylation en K14. B : profil du même peptide portant une double methylation en K9. ?? : profil de l'échantillon endogène. pic assigné en noir : pics ne permettant pas de différencier les profils de fragmentation A et B. en rouge : pics permettant de différencier les profils A et B. b : fragment de type b, portant la charge sur la partie amino-terminale de l'ion parent. y : fragment de type y, portant la charge sur la partie carboxy-terminale de l'ion parent. X : fragment de séquence non identifiée. (cf. schéma de fragmentation en annexe).

portant la diméthylation en sus (Figure 33, lignes 7 et 9). En revanche, l'anticorps commercial dirigé contre une double méthylation de K9 n'a pas d'affinité pour un peptide simplement phosphorylé (Figure 33, ligne 9). Il semble que l'anticorps 2H12 rassemblent les caractéristiques de ces deux anticorps. Il a une affinité légère pour la Lysine K9 diméthylée, et cette affinité n'est pas diminuée par la présence d'une phosphorylation sur la Sérine 10 (Figure 33, lignes 6 et 7).

Par spectrométrie de masse, nous n'avons pas détecté de phosphorylation sur le peptide retenu par H3. Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, ceci peut être expliqué par la grande instabilité des phosphorylations *ex vivo*.

V. DISCUSSION

a. Stabilité de la diméthylation de la Lysine K9 durant la mitose :

La vision la plus courante du code histone décrit la double méthylation de la Lysine 9 d'H3 comme une modification caractéristique de l'hétérochromatine. HP1 (Hétérochromatin Protein 1) la reconnaît et se lie à elle, pour rassembler les facteurs responsables de la compaction des nucléosomes. Cependant, HP1 est déplacée en début de mitose par la phosphorylation de la sérine 10 d'H3, considérée jusqu'il y a peu comme incompatible avec la méthylation de K9 (Rea *et al.*, 2000). Récemment, Mateescu *et al.* ont affirmé à l'aide d'expériences d'immunofluorescence, que cette double méthylation persiste probablement durant la mitose. En effet, leur anticorps dirigé contre les deux modifications concomitantes (Diméthyl-K9, Phospho-S10) reconnaît spécifiquement les cellules mitotiques. Selon leurs résultats, cet anticorps n'a aucune affinité pour un peptide d'H3 uniquement phosphorylé sur S10 (Mateescu *et al.*, 2004). Les tests de reconnaissance de peptides que nous avons faits avec cet anticorps montrent le contraire (Figure 33). Cependant, l'affinité *in vitro* d'un anticorps pour son antigène n'est pas la même qu'*in vivo*.

Malgré cela, l'étude de l'anticorps 2H12 et de son antigène nous permettent de confirmer l'existence d'H3 diméthylé sur la Lysine K9 pendant la mitose. La spectrométrie de masse, simple ou tandem, vient ici en renfort des techniques de biologie cellulaire classique mises en œuvre par Mateescu *et al.*

b. L'anticorps 2H12 reconnaît-il aussi la Sérine 10 phosphorylée sur H3 ?

L'identification de la diméthylation de K9 si satisfaisante qu'elle soit n'explique pas l'affinité très restrictive de l'anticorps pour les noyaux de cellules mitotiques. En effet, cette modification est aussi présente dans la chromatine durant les autres stades du cycle cellulaire. 2H12 reconnaît donc un épitope plus complexe que cette simple méthylation. Plusieurs possibilités existent : il peut s'agir d'une autre modification, non loin de K9. Différemment, L'épitope pourrait prendre une conformation propre durant la mitose, conformation que l'anticorps reconnaîtrait. Mais, cette hypothèse remet en cause le fait que les queues amino-terminales des histones ne soient pas organisées dans l'espace (Luger *et al.*, 1997). Enfin, l'affinité de 2H12 pour les chromosomes en mitose pourrait aussi reposer sur la reconnaissance d'un facteur inconnu, en interaction avec H3 uniquement pendant ce stade du cycle cellulaire.

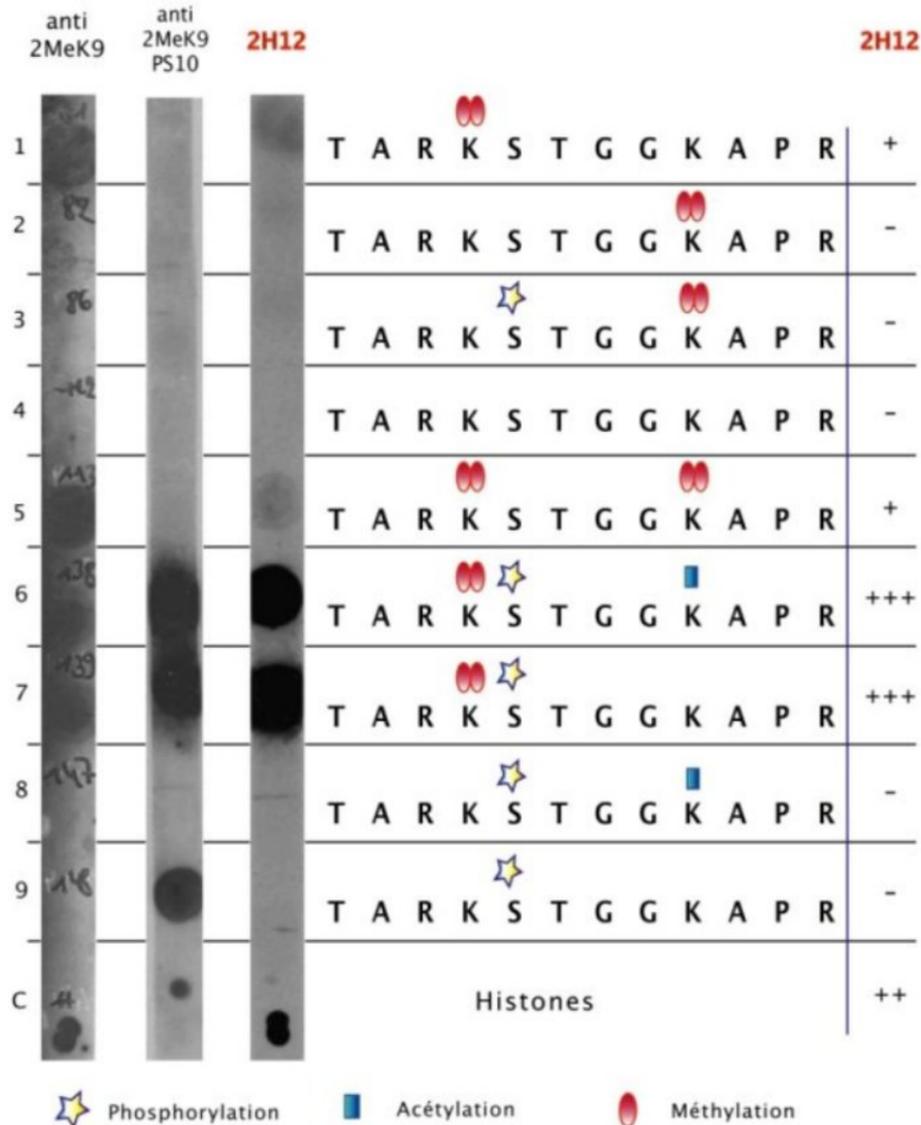


Figure 33 : Affinité de l'anticorps 2H12 pour différents peptides.

Méthode de Dotblot appliquée aux anticorps 2H12, Anti-H3 2MeK9-PS10, et anti-2MeK9. Les peptides modifiés déposés sur la membrane sont représentés selon la légende donnée, en bas de figure. La dernière ligne est un contrôle positif à l'aide d'histones purifiées. La colonne à l'extrême droite donne un aperçu de l'affinité de l'anticorps 2H12 pour les différents peptides modifiés (expérience réalisée par A. Eberlin).

Notre anticorps semble avoir une affinité plus grande pour le peptide d'H3 *in vitro* si celui-ci porte une Sérine phosphorylée, en plus de la double méthylation de K9. La présence des deux est primordiale, car le peptide simplement phosphorylé n'est pas reconnu.

L'absence de phosphorylation dans les expériences de spectrométrie de masse peut être expliquée par l'instabilité de cette modification covalente. Nous n'avons pas pris de précaution particulière pour limiter la dégradation des phosphorylations pendant la préparation des histones (inhibiteurs de phosphatases par exemple). Malgré le fait que les échantillons soient toujours manipulés à 4°C, il n'est pas impossible que ces modifications parmi les plus fragiles aient disparues avant que les histones soient au contact de l'anticorps. Une autre possibilité est que les groupements phosphates latéraux portés par les peptides soient dégradés pendant l'analyse de masse. En effet l'ionisation MALDI en mode positif, et la résolution par un analyseur temps de vol sont mal appropriées pour l'identification de peptides phosphorylés.

Nous avons tenté dans certains cas d'analyser en mode négatif les mélanges peptidiques issus des échantillons d'IP. La formation d'anion stabilise en effet les groupements phosphates, naturellement chargés négativement. Malgré cela, nous n'avons observé aucun peptide significativement retenu par l'anticorps 2H12 dans ces conditions.

Finalement, la présence d'une phosphorylation, en plus de la diméthylation, sur les histones H3 reconnus par l'anticorps est très probable, mais nous n'avons pu la confirmer par spectrométrie de masse.

c. Perspectives :

2H12 reconnaît la diméthylation de K9, mais celle-ci n'est pas spécifique de la mitose : sa présence ne suffit pas à expliquer l'affinité spécifique que montre l'anticorps lors d'expériences d'immunofluorescence pour les cellules mitotiques. La phosphorylation de la Sérine 10 pourrait compléter l'épitope et justifier cette exclusivité. Par ailleurs, la participation d'autres phosphorylations notamment sur la Thréonine 3 et la Sérine 28 ne peut être exclue, pour les mêmes raisons d'instabilité que nous avons évoquées ci-dessus. Une première expérience à faire pour étudier ces hypothèses serait de préparer des histones de façon très précautionneuse, en présence d'inhibiteurs de phosphatases. Ceux d'entre eux que l'anticorps 2H12 retient en immunoprécipitation pourraient être séparés et digérés de la même façon que précédemment. En revanche, l'analyse des peptides par spectrométrie de masse devrait être menée différemment. En effet, il serait préférable d'utiliser un mode d'ionisation en phase liquide, à l'aide d'une source nanoESI par exemple. Les pertes de groupements phosphates seraient ainsi limitées. De plus, les échantillons devraient être analysés successivement en modes positifs et négatifs. Enfin, l'étude des spectres obtenus doit tenir compte de la présence des phosphorylations, qui peuvent avoir perturbé la digestion enzymatique. Nous avons observé sur des peptides synthétiques, que la phosphorylation de S10 par exemple empêche la protéase Arg-C de découper sur son site habituel (après l'Arginine R8). La masse à rechercher dans un échantillon endogène correspondrait alors à celle de la séquence 3-TKQTARKSTGGKAPR-17 diméthylée et phosphorylée (soit 1337,7 Da).

Dans l'hypothèse où notre anticorps reconnaît effectivement la diméthylation de K9 accompagnée de la phosphorylation de S10, il est important de s'interroger sur la fonction de cette double modification *in vivo* dans la compaction des chromosomes. Si l'hypothèse du code histone s'applique aussi dans ce cas, certaines protéines spécialisées devraient se lier aux extrémités amino-terminales d'H3 qui portent cette double modification. Des protéines dotées de Bromodomains peuvent de cette façon reconnaître des queues d'histones spécifiquement acétylées (MCAP ou Brd4 (*Dey et al., 2000 ; Dey et al., 2003*)). Cependant, la phosphorylation est une modification encombrante. Il est peu probable qu'un chromodomaine classique reconnaisse la double méthylation sur K9 en présence de la phosphorylation : Il faudrait donc rechercher un facteur doté d'un chromodomaine atypique. Ceci peut se faire dans un premier temps par alignement de

séquences afin d'isoler quelques candidats. Ces derniers pourraient alors être soumis à des tests d'interaction *in vitro* avec le peptide ou la protéine doublement modifiés (« GST pulldown » ou compétition, par exemple).

Dans le cas où d'autres sites phosphorylés distants participent à la reconnaissance d'H3 par l'anticorps 2H12, une approche structurale serait très intéressante. L'épitope de TAF10 contre lequel il était dirigé a une séquence très différente de celle du peptide d'H3 que nous avons isolé (si l'on exclue un motif KS central), mais ce dernier peut s'organiser dans l'espace de façon à présenter aux sites de reconnaissance de l'anticorps une surface proche de l'épitope original. Cette conformation spatiale pourrait être spécifique de la compaction de l'ADN en chromosome mitotique. Cette hypothèse va à l'encontre de la vision commune qui veut que les extrémités amino-terminales des histones ne soient pas structurées dans l'espace. Mais cette observation a été faite sur des nucléosomes libres, et rien ne permet d'affirmer qu'il en est de même au sein de la chromatine durant la mitose. Au contraire, la grande densité de celle-ci oblige peut-être les queues d'histones à se replier, et un facteur de type chaperon pourrait les y aider. L'identification de cet éventuel facteur apporterait beaucoup à la compréhension de l'organisation des chromosomes en mitose.

La première approche pourrait consister à tester l'affinité de l'anticorps 2H12 pour des peptides « repliés » artificiellement. Ceux-ci peuvent être obtenus en introduisant un pont chimique entre deux chaînes latérales distantes par exemple. Une autre possibilité est d'utiliser des peptides dans lesquels les acides aminés séparant les pôles de reconnaissance supposés ont été éliminés ou remplacés par d'autres.

Si ces expériences donnent des résultats intéressants, l'épitope structural ainsi déterminé pourrait servir « d'hameçon » pour rechercher des facteurs se liant à lui spécifiquement. Le peptide lié à une résine appropriée (Sulfolink par exemple) serait mis au contact d'un extrait nucléaire de cellules mitotiques, puis les protéines retenues seraient caractérisées par des méthodes classiques (MS, western blot...)

Une question reste ouverte. La phosphorylation de S10 apparaît spécifiquement pour la mitose, tandis que la diméthylation de K9 existe auparavant dans les régions du génome organisées en hétérochromatine. À la transition G2/M, deux événements sont possibles : les S10 d'H3 sont phosphorylés tandis qu'aucune méthylation supplémentaire de 9 n'est ajoutée. Dans ce cas le signal de l'anticorps 2H12 est du uniquement aux zones organisées avant la compaction mitotique en hétérochromatine. De plus, certains gènes actifs durant l'interphase et la phase G2, non marqués par la diméthylation de K9, devraient le rester durant la mitose. Des expériences de Chip avec l'anticorps 2H12 sur les promoteurs et séquences codantes de ces gènes permettrait de déterminer s'ils sont diméthylés durant la mitose, et d'apporter une réponse partielle à cette question.

Dans l'autre cas, l'anticorps 2H12 reconnaît une diméthylation globale et régulièrement répartie de K9, qui est nécessaire à la compaction, et apparaît en début de mitose. La distinction entre ces deux possibilités nécessite une observation à haute résolution de la structure du chromosome mitotique, peut être hors du contexte cellulaire. Par ailleurs, une hybridation *in situ* (FISH) peut être utilisée pour marquer un locus actif durant l'interphase, puis le suivre durant la mitose, et observer son éventuelle diméthylation à l'aide de 2H12. Il serait aussi intéressant de tester le marquage par l'anticorps de chromosomes polyténiques de drosophile, afin de savoir s'il reconnaît une autre forme d'organisation de la chromatine.

Pour conclure, mes travaux et ceux d'Adrien Eberlin montrent que l'anticorps 2H12 reconnaît un épitope dans la chromatine mitotique encore non identifié. Cet épitope contient une portion de la queue de l'histone H3, diméthylée en Lysine 9, et très probablement phosphorylé en Sérine 10. Le fait que cette combinaison de modifications, déjà détectée spécifiquement par immunofluorescence, ne donne pas le même recouvrement des chromosomes nous incite à penser qu'elle ne suffit pas à définir l'épitope. La caractérisation complète du motif de reconnaissance de 2H12 nécessite donc encore quelques travaux, qui déboucheront sûrement sur la mise à jour d'un caractère particulier de la chromatine en mitose.

PARTIE III

COLLABORATIONS

I. Identification d'un paralogue humain d'ADA2, actif dans la régulation de la transcription dépendante de Gcn5 et Brg1.

Les facteurs dit adaptateurs sont des composants de nombreux complexes HAT autant chez la levure que chez l'homme. Ils sont à la fois des sous-unités structurales (Sternier *et al.*, 1999), et la cible d'activateur (Barlev *et al.*, 1995 ; Silverman *et al.*, 1994). Dans le but de comprendre le rôle de l'homologue humain de *scADA2* en relation avec les HAT Pcaf et Gcn5, le laboratoire du Dr Berger a entrepris d'identifier par un criblage double hybride chez la levure les partenaires potentiels de la région de Pcaf comprenant le domaine d'interaction avec ADA2. Un des meilleurs interagissants était une protéine homologue à *scADA2* mais différente d'*hsADA2* connu jusqu'alors. Ceci a conduit à différencier deux formes d'ADA2 chez l'homme et à caractériser leur comportement différent dans l'activation de la transcription. La principale conclusion de ce travail est qu'ADA2 β s'associe sélectivement à Gcn5 pour activer la transcription dépendante de l'activateur Pax5, ce que ne fait pas ADA2 α .

J'ai participé à ce travail en montrant que la forme nommée ADA2 β n'apparaissait pas dans le complexe TFTC purifié.

L'étude de Barlev *et al.* montre aussi qu'ADA2 β est absent du complexe Swi/Snf purifié, comme TFTC, dans des conditions fortement salines (0,5 M KCl), malgré son association *in vivo* avec Gcn5, Brg1 ou Snf5. Cette observation entre dans le cadre d'une modularité des complexes, dans lesquels certaines sous-unités comme ADA2 β seraient très faiblement liées.

Cette étude, associée aux études précédentes sur les facteurs adaptateurs, tend à prouver que l'homologue ADA2 présent dans les complexes multi-protéiques connus est ADA2 α , tandis qu'ADA2 β s'associe à une ou plusieurs autres structures. Les deux protéines participent très probablement à la régulation de gènes différents.

De façon indépendante, deux homologues d'ADA2 ont aussi été identifiés chez *D. melanogaster* par deux études indépendantes (Kusch *et al.*, 2003 ; Muratoglu *et al.*, 2003). J'ai observé que les numéros d'accès dans les banques de données pour le gène de *dmADA2 α* ne correspondent pas à la même séquence d'acides aminés. De plus, la détection de cette protéine à l'aide d'anticorps polyclonaux dans l'une des études montre deux protéines de tailles très différentes (40 et 60 kD ; Figure 5B de (Muratoglu *et al.*, 2003) par exemple). Il est donc très probable qu'un autre paralogue d'ADA2 existe chez la drosophile à la suite de l'épissage alternatif du gène. Il serait intéressant de savoir si cette situation est retrouvée chez l'homme.

II. *Etude du recrutement des facteurs de transcription sur le promoteur Hsp70 de drosophile, en relation avec son activation.*

La drosophile est un modèle animal prisé des biologistes car elle se reproduit vite, et produit des phénotypes facilement observables en cas de mutation, autant aux différents stades larvaires, qu'à l'âge adulte.

Par ailleurs, elle est très utile aux études de régulation de la transcription, car elle possède, comme d'autres diptères, des chromosomes polyténiques dans les cellules de glandes salivaires. Ces « chromosomes » sont en réalité formés des nombreuses copies d'une même chromatide alignées côte à côte. Ils résultent de répliquions multiples de l'ADN sans division cellulaire, qui génère des cellules polyploïdes. Cependant, ces cellules gardent une organisation de la chromatine proche de celle d'une cellule haploïde normale, car elles peuvent passer très rapidement d'un état polyténique à un état non organisé (où les chromatides homologues ne sont plus alignées). L'intérêt majeur de leurs chromosomes est l'apparition de bandes de chromatine plus ou moins condensées, qui correspondent, selon l'idée généralement admise, à des zones d'hétérochromatine (zones denses) et des zones d'euchromatine (zones moins denses, appelées interbandes). La distribution de bandes et d'interbandes est fixe, et a fait l'objet d'une classification et d'une numérotation, qui permettent à un expérimentateur entraîné de retrouver une bande précise d'une expérience à l'autre. De plus, il a été observé par immunofluorescence que les zones de transcription très active forment des nodules sur les chromosomes polyténiques.

L'équipe du Dr S. Georgieva utilise la drosophile comme modèle animal dans l'étude des mécanismes de transcription. En collaboration avec notre laboratoire, Lyuba Lebedeva a voulu tirer parti de la particularité des chromosomes polyténiques pour observer le recrutement des facteurs de transcription sur des loci spécifiquement activés.

Dans cette étude, j'ai assumé la caractérisation et la purification des anticorps dirigés contre *dmTRRAP* et *dmTAF10*.

De façon surprenante, nos résultats montrent que les facteurs généraux de la transcription TFIIB et TFIIF, ainsi que TBP et quelques TAFs ne sont pas recrutés sur le promoteur du gène *hsp70*, rendu actif par choc thermique. À l'inverse, l'ARN pol II, *dmTRRAP*, *dmGcn5* et une sous-unité du médiateur *dmMed13* sont nettement recrutés. Ceci est d'autant plus étonnant que l'ensemble des facteurs testés est présent sur le promoteur avant induction du gène par choc thermique.

Parmi les hypothèses permettant d'expliquer ce mécanisme d'activation apparemment particulier, deux sont très intéressantes.

D'une part, il peut s'agir majoritairement de ré-initiation de la transcription, pour laquelle TFIIB, TFIIF, et TFIID ne seraient pas nécessaires. L'expression très importante du gène sur un court laps de temps justifie que plusieurs polymérases transcrivent à la suite la séquence codante, et donc soient amenées sur le site d'initiation par un mécanisme de ré-initiation et non d'initiation *de novo*. Dans ce cas, les facteurs cités ci-dessus ne feraient pas partie du PIC de ré-initiation de la transcription.

D'autre part, l'activation subite du gène peut reposer sur une mode de recrutement des facteurs de transcription très dynamique, par comparaison à l'état inactif, dans lequel ils seraient associés statiquement au promoteur. Ainsi, TBP, TFIIB, TFIIF et certains TAFs seraient nécessaires à l'initiation de la transcription du gène *hsp70*, mais n'apparaîtraient sur le promoteur que de façon cyclique et très transitoire, le temps d'y ancrer une polymérase.

Une dernière hypothèse serait que la transcription massive des gènes « heatshock », en cas de choc thermique soit réellement indépendante des facteurs non détectés. Cette hypothèse n'est pas évoquée dans le manuscrit joint à ce paragraphe, car elle était peu étayée au moment de son écriture. Une étude récente

chez la levure montre que les gènes dépendant de TFIID ne sont pas les mêmes que ceux dépendant du complexe SAGA. Ce dernier serait particulièrement nécessaire à l'activation des gènes de réponse au stress (*Huisinga et Pugh, 2004*). Notre étude permet d'élargir cette hypothèse, considérant que les gènes « heatshock » répondent à un stress thermique. Leur transcription serait particulièrement dépendante des facteurs de TFIC, TRRAP et GCN5, ainsi que du médiateur, mais indépendante de TBP et des GTFs TFIIB et TFIIIF.

MATERIEL ET METHODES :

I. Biologie moléculaire et cellulaire:

Immunoprécipitation:

Dans le cas d'un extrait brut (total ou nucléaire), une pré-clarification est réalisée : pour cela une fraction de résine équivalente à ce qui va être utilisé pour l'IP est équilibrée et incubée avec l'extrait pendant le temps de liaison de l'anticorps à la résine d'IP.

Une fraction de résine équivalente au dixième du volume d'extrait à incuber est équilibrée dans un tampon IP100 (25 mM trisHCl pH 7,9 ; 5 mM MgCl₂ ; 10% glycérol ; 0,1% NP40 ; 100 mM KCl ; 0,3 mM DTT). Une quantité d'anticorps déterminée par l'expérience y est ajoutée, diluée dans 10 fois le volume de résine d'IP100, et ceci incubé à RT pendant 1h. La résine d'IP est alors lavée deux fois par 10 volumes de tampon IP500 (même composition que l'IP100 à l'exception de la concentration en KCl = 500 mM), puis deux fois 10 volumes de tampon IP100.

Les protéines attachées à l'anticorps peuvent être récupérées par dénaturation à 100°C en présence de SDS et DTT, ou sous forme native par compétition du peptide épitope.

La dénaturation se fait en ajoutant à la résine lavée du tampon Laemli (Laemmli 4x : 100mM tris pH 6,8 ; glycérol 30%, SDS 4%, Bromophénol bleu 0,2% ; 100 mM Dithiothreitol ; à diluer dans du tampon de migration SDS PAGE), et en portant ce mélange à 100°C pendant 5 min.

L'élution native se fait par incubation de la résine lavée avec le peptide diluée à 1 mg/ml dans de l'IP100, incubée soit à RT pour 1h, soit à 4°C pour 3-4h. Ceci peut être répété plusieurs fois pour un rendement optimal.

Purification d'un anticorps polyclonal par affinité pour l'épitope:

Un volume CV de résine Sulfolink (PIERCE, 1 ml pour 20 ml de serum) est équilibrée par lavage avec 6 Cv de solution A (50 mM trisHCl pH 8,5 ; 5 mM EDTA ; ajuster le pH avec HCl), puis incubé pendant 45 min à RT avec 2 mg peptide épitope dans du PBS, par ml de résine. Elle est alors lavée avec 3 CV de la même solution A. Les sites de liaison encore libres sur la résine sont bloqués par incubation pendant 45 min avec 1 CV de 0,05 M cystéine dans la solution A, puis la résine bloquée est lavée 4 fois avec 4 CV de 1M NaCl et 4 fois 4 Cv d'eau MQ. Un dernier lavage est réalisé avec 3 CV de PBS. A ce stade la résine Sulfolink peut être gardé à 4°C jusqu'au lendemain. Avant application, le serum est centrifugé à 5000 rpm pendant 15 min, pour éliminer les débris en suspension. Le surnageant est passé deux fois sur la colonne de résine puis le tout est transféré dans un tube et incubé sous agitation à RT pour 1h minimum. Après cela le serum est récupéré et gardé, tandis que la résine est lavée tout d'abord avec 8 CV de PBS, puis 4 CV de solution B (20 mM trisHCl pH 7,5 ; 1 M NaCl), et à nouveau 5 CV de PBS. L'anticorps lié à la résine est élué par fractions de 500 µl, en ajoutant au total 4-5 CV de 0,1 M glycine pH 2,8. Les fractions sont collectées dans des tubes contenant 30 µl de 1M trisHCl pH 9,5 pour neutraliser la glycine. Leur teneur en anticorps est testée par gel SDS PAGE coloré au bleu de commassie et mesure de concentration protéique Bradford. Les fractions sont immédiatement dialysées 2h contre du PBS 20% glycérol, puis toute la nuit contre du PBS 10% glycérol.

Purification d'un anticorps monoclonal par précipitation à l'acide caprylique :

L'ascite à purifier est centrifugé à 4000 rpm à 4°C pendant 10 min, sauf une fraction qui est mise de côté. Le surnageant de volume VS est transféré dans un grand tube et précipité comme suit : on y ajoute 2 VS de 50 mM acétate de sodium pH 4, et on vérifie le pH du mélange qui doit se situer vers 4,8. 3/100 de VS d'acide caprylique est ajouté goutte à goutte en mélangeant, et la précipitation est incubée 30 min à RT sous agitation. Après cela, le mélange est centrifugé à 10 000 rpm pendant 30 min à 4°C. Le surnageant limpide contenant l'anticorps est récupéré et son pH est ajusté à 7 par ajout de 2M tris pH 7,8. Il est ensuite précipité au sulfate d'ammonium saturé pH 7,8 (autant que le volume du surnageant) sous agitation, pendant 1h à 4°C. Une seconde centrifugation à 10 000 rpm pendant 30 min à 4°C est réalisée et on récupère cette fois le culot. Il est repris dans un tampon de dialyse (10 mM tris

pH 7,9 ; 50% glycérol ; 0,5 mM Dithiothreitol ; 0,5 mM EDTA ; 50 mM KCl), et dialysé toute la nuit contre ce même tampon.

Test de « Non Homologous End Joining *in vitro* :

80 µg d'extrait total de cellules lymphoblastoïdes AHH-1 sont incubés avec un fragment d'ADN double brin (40 ng), obtenu par digestion d'un plasmide de 3000 bp, et purifié sans BET. Cette réaction contient un tampon de end joining, ajouté 5 fois concentré (5 µl pour 25 µl de 250 mM trisHCl pH 8 ; 333 mM acétate de potassium ; 2,5 mM acétate de magnésium ; 5 mM Dithiothreitol ; 5 mM ATP ajouté extemporanément ; 0,5 mg/ml Bovin Serum Albumin), et de l'eau pour atteindre 25 µl. Après une incubation de 2h à 37°C, on ajoute 4 µl d'une solution de déprotéinisation (2,5 mg/ml Protéinase K ; 50 mM EDTA pH 8 ; 2,5% SDS ; 100 mM trisHCl pH 7,5), et incubé à nouveau 45 min à 37°C. La réaction est alors diluée à 100 µl par de l'eau et 25 µl de cette dilution sont déposée sur un gel d'agarose 0,7% sans bromure d'éthydiu. La résolution des fragments d'ADN se fait par une migration pendant 14 à 16h à 22-24 mA.

Les fragments sont détectés par transfert sur une membrane de PVDF (southern blot) et hybridation avec une sonde marquée radioactivement.

En cas de déplétion préalable de l'extrait, un volume d'anticorps inférieur à 3 µl est ajouté à l'extrait déjà diluée avec le tampon de end joining et l'eau mais sans le fragment d'ADN. La déplétion est incubée pendant 1h sur la glace puis mise en présence de 25 µl de résine sépharose couplée à la protéine G, équilibrée au préalable dans le tampon de end joining (sans ATP), pendant 30 min à RT. Au surnageant récupéré par centrifugation rapide est ajouté le fragment d'ADN et de l'ATP fraîchement diluée pour atteindre une concentration finale de 1 mM, et la réaction de end joining est réalisée comme décrit ci dessus. 1 µl de la réaction est mis de côté pour un contrôle de la déplétion par western blot.

L'ajout facultatif de protéines exogènes (complexes recombinants, surnageant d'IP) est fait dans tous les cas en même temps que l'ajout du fragment d'ADN.

Transfection de cellules HeLa :

Les cellules HeLa utilisés dans ce travail ont été transfectées à l'aide de deux méthodes. Pour la transfection de plasmide, le JetPei (PolyLabo) était utilisé. Pour la transfection de petits ARN interférants, La lipofectamine était préférée malgré sa plus grande toxicité.

Immunofluorescence :

Toute cette procédure est menée à RT.

Les cellules adhérentes (Hela ou fibroblastes Nalm6) sont cultivées dans des boîtes de 10 cm en présence de lamelles couvre-objet sur lesquelles elle se déposent. Les lamelles sont transférées dans des boîtes à 6 puits, et lavées rapidement au PBS (2 ml par puit). Elles sont rincées au tampon CSK (1 mM PIPES pH 7 ; 100 mM NaCl ; 300 mM sucrose ; 3 mM MgCl₂ ; 0,5 mM PMSF ; 1x PIC) pendant 3 min. Les cellules sont perméabilisées (optionnel) pendant 6 min dans du tampon CSK + 0,5% triton. Après cela, on pratique 2 lavages au CSK, puis une fixation des cellules par incubation dans du 2% paraformaldéhyde 20 min. Les lamelles sont alors lavées trois fois dans du PBS, 1 fois rapidement, et les deux suivantes pendant 5 min, puis bloquées 20 min dans une solution à 5% (w/v) de BSA et 0,1% Tween dans du PBS, et enfin lavées rapidement dans du 0,1% Tween PBS. L'incubation avec l'anticorps primaire se fait dans du 5% BSA ; 0,1% tween PBS, soit à RT pendant 1h, soit toute la nuit à 4°C (20 µl du mélange suffisent par lamelle). Les lamelles sont lavées 3 fois au 0,1% Tween PBS, une fois rapidement, 2 fois pendant 5 min, puis on applique l'anticorps secondaire dans 5% BSA ; 0,1% tween PBS pendant 30 min à RT (200 µl par lamelle). L'ADN est coloré par incubation de quelques secondes dans une solution de 1 µg/ml DAPI dans du PBS. Enfin les lamelles sont lavées trois fois comme précédemment, et montées sur des lames, avec un milieu Vectashield (fab ???).

Induction locale de cassures double brin par irradiation laser :

Cette méthode est adaptée de (Rogakou *et al.*, 1999). Les cellules adhérentes sont cultivées en présence de lamelles couvre-objet marquée d'une croix par abrasion. Elles doivent atteindre une confluence de 50 à 75% au moment de l'expérience. Les cellules sont traitées au colorant Hoechst (Hoechst 33258 à 10 µg/ml final dans le milieu) pendant 5 min à RT. La lamelle est placée sous l'objectif d'un microdissecteur (LEICA ???) et les cellules

sont observées en lumière blanche. Elles sont alors irradiées localement à l'aide d'un laser Leica émettant à 390 nm, focalisé à travers l'objectif, réglé de la façon suivante : ouverture = 3 ; intensité = 22 ; vitesse = 5 et offset = 30. Après irradiation, les cellules sont remises en incubateur dans un milieu frais, pour récupérer un temps plus ou moins long. Un marquage immunologique est réalisé comme pour une immunofluorescence classique.

Test de « Non Homologous End Joining » *in vivo* :

Des cellules HeLa sont transfectées tout d'abord avec un siRNA contre la protéine à inhiber ou un siRNA contrôle, à l'aide de lipofectamine 2000 (Invitrogen) dans du milieu Optime-M + glutamax (Gibco). 6h plus tard, le milieu est changé pour un milieu de culture classique (DMEM...), et les cellules sont transfectées par le JetPei (Poly+ Labo) avec un vecteur d'expression de la GFP, ouvert ou non au préalable par digestion enzymatique EcoRI entre le promoteur et la séquence codante. 48h et 72h plus tard, les cellules sont récoltées, lavées au PBS, et réparties en deux fractions : l'une sert à préparer un extrait protéique total par congélation/décongélation dans un tampon salin (voir le tampon 1 de l'extraction protéique totale). L'autre est soumise à un tri cellulaire permettant de détecter les cellules exprimant la GFP par excitation laser. Pour cela, la suspension de cellules dans le PBS est filtrée pour éliminer les agrégats et introduite dans le FACS-xcalibur (fab ???). 30 000 cellules sont comptées, et seules celles ayant une taille réaliste, et émettant un signal supérieur au seuil d'autofluorescence sont comptabilisées. Les résultats sont normalisés par rapport au nombre de cellules totales.

Parallèlement, l'ADN d'une fraction de cellules est récupéré par extraction phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol. Sa concentration est calculée par mesure de densité optique, et il est transformé dans des bactéries compétentes (DH5). Après une nuit d'incubation à 37°C, le nombre de colonies, représentant la quantité de vecteurs reliés par les cellules, est compté et normalisé par rapport à la concentration d'ADN total.

Test HAT *in vitro* :

Cette méthode est tirée de (*Brand et al., 1999b*). Les complexes purifiés, ou les résines d'immunoprécipitation lavées sont incubées avec 1 µg d'histones de cellules HeLa purifiées et 1,6 nmol de ³H acetylCoA dans une solution 1 (50 mM TrisHCl pH 8 ; 10% glycérol ; 0,1 mM EDTA ; 50 mM KCl ; 20 mM butyrate de sodium, 1 mM DTT extemp.) pendant 1h à 30°C. La réaction est alors déposée sur un gel SDS PAGE à 15% d'acrylamide, pour séparer les histones. Le gel est coloré au bleu de comassie, scanné, puis traité au Diphenyloxazol (Amersham) pour intensifier le signal de l'acetylCoA tritiée. Il est enfin séché à l'air libre entre deux feuilles de cellophane et exposé contre un film d'auto-radiographie pendant plusieurs jours. L'équilibration de différents complexes ou résines ajoutés et faite par WB.

Fractionnement de protéines sur gradient de glycérol :

Les protéines à fractionner (extrait nucléaires ou surnageant d'IP) sont tout d'abord dialysées contre un tampon D (50 mM TrisHCl pH 7,9 ; 10 % glycérol ; 0,1 mM EDTA ; 0,5 mM Dithiothréitol, 50 mM KCl). Le gradient de glycérol de 3,8 ml est préparé dans un tube résistant à l'ultracentrifugation à l'aide d'un Auto densiflow (Buchler) et s'étend de 20 à 40% de glycérol de haut en bas. La fraction dialysée est déposée en haut du gradient, en parallèle avec des marqueurs de hauts poids moléculaire (HMW, Pharmacia) dans le même tampon. Les gradients sont soumis à la même centrifugation de 8h à 55000 rpm dans un rotor SW60 Ti à balancier. Des fractions de 200 µl sont alors récoltées, et celles des marqueurs de PM déposées sur un gel SDS PAGE à colorer au bleu de comassie. Celle de l'échantillon sont concentrées et déposées sur un gel pour détection par western blot.

Extrait nucléaire de cellules congelées :

Cette procédure est adaptée pour 10¹⁰ à 10¹¹ cellules congelées en suspension très concentrée, et doit être menée à 4°C (chambre froide ou sur la glace, avec des tampons et des instruments refroidis). Les solutions doivent être stériles.

Les cellules sont centrifugées dans des pots à couvercle d'environ 400 ml, à 4°C et 1500 g pendant 10 min. Le culot est repris dans 100 ml de PBS froid à la pipette, et on mesure le volume de cellules compactées (PCV) en mesurant le volume total moins les 100 ml ajoutés. Les cellules sont à nouveau centrifugées dans les mêmes conditions, et reprises dans 5 PCV de tampon hypotonique A (10 mM TrisHCl pH 7,9 ; 1,5 mM MgCl₂ ; 10 mM KCl ; PIC extemp. ; 1 mM PMSF extemp.), puis laissé ainsi pendant 10 min. Une nouvelle centrifugation à 600 g et à 4°C pendant 10 min est réalisée et le culot est repris dans 2 CV de tampon hypotonique A, puis transféré dans un homogénéiseur « dounce », où les cellules sont soumises à une première lyse mécanique avec un piston B (serré, 10 allers-retours). L'efficacité de la lyse est vérifiée par coloration d'une petite fraction de cellules au colorant « trypan

bleue », et observation au microscope. Les noyaux sont récupérés par centrifugation dans des tubes d'environ 40 ml pendant 10 min à 800 g et 4°C. Le surnageant est enlevé, et le culot centrifugé à nouveau, à 15 000 g et 4°C pendant 30 min. Le culot récupéré est repris dans 12 ml de tampon C (20 mM HEPES potassium pH 7,6 ; 620 mM KCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 0,2 mM EDTA ; PIC extemp ; 2 mM DTT extemp ; 0,2 mM PMSF extemp), et on estime le volume de noyaux compactés (NPV) en mesurant le volume total moins les 12 ml. On complète si nécessaire avec le tampon C de façon à obtenir une suspension de 2 NPV. Celle-ci est transférée dans l'homogénéisateur et soumise à une lyse mécanique par 10 allers-retours de piston B(serré). Le lysat est versé dans un tube à bouchon de 40 ml résistant à l'ultracentrifugation, et incubé sous agitation à 4°C pendant 30 min ; enfin le lysat est centrifugé à 15 000 g et 4°C pendant 40 min. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est dialysé dans un boudin de dialyse d'abord contre le tampon D200 (20 mM HEPES potassium pH 7,6 ; 200 mM KCl ; 0,2 mM EDTA ; 17% glycérol ; 2 mM dithiothréitol extemp ; 0,25 PMSF extemp) avec 2 à 3 changements de tampon en 2h. Il est remplacé alors par le tampon D100 (le même que D200, mais avec 100 mM de KCl), et on répète 2 à 3 changements de tampon en 3h.

Extrait protéique total :

Par congélation/décongélation :

Les cellules dans leur milieu de culture sont centrifugées à 1000 g pendant 10 min puis reprises deux fois dans du PBS (phosphate buffer saline, Dubelco) froid. Le culot est alors à nouveau repris dans le tampon d'extraction 1 (20 mM TrisHCl pH 7,5 ; 400 mM KCl ; 20% glycérol ; 2 mM Dithiothreitol, PIC. Volume : environ 400 µl pour une boîte de culture de 175 cm² confluente). L'extrait est soumis à 4 cycles de congélation dans l'azote liquide puis décongélation à RT, et le surnageant contenant les protéines solubles est récupéré par centrifugation à 12 000 g pendant 20 min.

Variante par lyse mécanique (Dounce) :

Cette méthode évite la congélation/décongélation qui peut réduire l'activité de l'extrait. Elle a été utilisée notamment pour extraire les protéines recombinantes issues de baculovirus

Après le lavage des cellules, le culot est repris dans un tampon d'extraction 2 (20 mM TrisHCl pH 7,5 ; 250 mM NaCl ; 10% glycérol ; 1 mM β-mercaptoéthanol ; 2 mM PMSF ; si nécessaire 10 mM fluorure de sodium ; 2 mM orthovanadate de sodium ; 10 mM β-glycérophosphate). Le mélange est soumis à une lyse mécanique par 10 allers-retours dans un dounce à l'aide d'un piston B (« serré »). L'extrait clarifié est récupéré par centrifugation à 12 000 g pendant 20 min.

Extrait de protéines solubles en milieu acide :

Les cellules récupérées en culture sont lavées au PBS froid, puis reprises dans le tampon de lyse (10 mM HEPES pH 7,9 ; 1,5 MgCl₂ ; 10 mM KCl ; 0,5 mM DTT extemp. ; 1,5 mM PMSF extemp.). On y ajoute alors de l'acide chlorhydrique 12 M pour obtenir une concentration finale de 0,2 M, et on incube l'extraction 30 min sur la glace. Le mélange est centrifugé à 11 000 g et 4°C pendant 10 min, et le surnageant contenant les protéines solubles en condition acide est récupéré. Il est alors dialysé 2 fois 1h contre une solution à 0,1 M d'acide acétique, puis 3h et toute la nuit contre une solution à 10% de glycérol.

Cette procédure peut être appliquée au culot résultant d'une extraction de protéine totale en omettant l'étapes de lavages des cellules.

Extrait protéique total pour le NHEJ *in vitro* :

Cette procédure mise au point originellement par (*Baumann et West, 1998*) a été adaptée de (*Baldehyron et al., 2002*). Cette méthode d'extraction plus douce que l'extraction par congélation-décongélation permet de conserver dans la mesure du possible leur activité fonctionnelle aux facteurs à étudier. Elle doit être menée impérativement au froid, avec de la verrerie et des tampons stériles et refroidis, et est adaptée au traitement de 10⁹ cellules en suspension.

Les cellules sont centrifugées dans des pots à couvercle d'environ 400 ml, à 4°C et 1500 g pendant 10 min. Le culot est repris dans 100 ml de PBS froid à la pipette, et la même procédure est répétée. Le second culot est repris dans 40 ml de PBS froid par litre de suspension de départ, et transféré dans des tubes falcon de 50 ml pour être à nouveau centrifugé à 800 g et 4°C pendant 5 min. Le culot est repris dans 10 ml de PBS froid par ml de suspension initiale, et on mesure le volume de cellules compactées (PCV) en mesurant le volume total moins le PBS ajouté. On ajoute 5 PCV de tampon hypotonique HLB (10 mM Tris pH 7,8 ; 1 mM EDTA ; 5 mM DTT extemp.), et on resuspend le culot par inversion des tubes (pas en pipettant), et on laisse le mélange sur la glace pour 20 min. Il est alors transféré dans un homogénéisateur « dounce », pour subir plusieurs cycles de lyse. On ajoute 2 µl de 0,5 M PMSF, et on fait 2 allers-retours de piston B(serré), puis on ajoute 2 µl d'inhibiteur de protéase aprotinine à 7 TIU/ml et on fait 3

allers-retours de piston, puis enfin on ajoute 1 µl de pepstatin (1 mg/ml), 1 µl chymostatine (1 mg/ml), 1 µl leupeptine (1 mg/ml) avant de faire 15 allers-retours de piston B. Une fraction de la suspension est colorée au Tryptan Blue pour observer l'effet de la lyse au microscope.

Le lysat est laissé sur la glace pendant 20 min, avant d'ajouter goutte à goutte, 0,5 PCV de tampon de lyse HS (50 mM trisHCl pH 7,5 ; 1 M KCl ; 2 mM EDTA ; 2 mM Dithithréitol). Il est alors centrifugé dans des tubes de 15 ml (13x51 mm par exemple) dans un rotor à balancier SW41 Ti à 37 000 rpm (ultracentrifugeuse), pendant 3 h à 4 °C. Le surnageant est récupéré en évitant la couche de lipides qui le couvre, et on le transfère dans des boudins de dialyse, équilibré au préalable dans le tampon E (20 mM trisHCl pH 8 ; 100 mM KOAc ; 20% glycérol ; 0,5 mM EDTA ; 1 mM DTT extemp.). Trois dialyses successives de 1h30 contre ce tampon sont réalisées, et l'extrait est récupéré. Il est à nouveau centrifugé à 14 000 rpm s'il contient des débris visibles, puis aliquoté et conservé à -80°C. Un tube décongelé n'est jamais réutilisé pour un test fonctionnel.

Purification d'octamères d'histones en condition saline :

Cette méthode est adaptée de (Cote *et al.*, 1993). 5 milliards de cellules Hela cultivées en suspension sont lavés trois fois au PBS froid. Après centrifugation à 1500 rpm (10 min, 4°C), elles sont resuspendues dans 150 ml de tampon 1 (tris-HCl 10 mM pH 7,9 ; MgCl₂ 1,5 mM ; KCl 10 mM, DTT 0,5 mM ; PMSF 0,2 mM ; PIC 1x) et incubées sur la glace pour 10 min. Les cellules sont alors centrifugées à 2000 rpm (4°C, 10 min), et le culot est resuspendu dans 60 ml du même tampon 1, puis lysé par 10 allers-retours dans un broyeur (Dounce) avec un piston B. Après centrifugation à 2500 rpm (4°C, 10 min), le culot est lavé 3 fois avec 50 ml de tampon 1, et les noyaux sont repris avec précaution dans 15 ml de ce tampon. Ils sont agités doucement à 4°C, et on y ajoute 15 ml du tampon 2 (tris-HCl 10 mM pH 7,9 ; MgCl₂ 1,5 mM ; KCl 600 mM ; Glycérol 10% ; DTT 0,5 mM ; PMSF 0,2 mM ; PIC 1x). Les noyaux sont laissés à incuber pendant 10 min supplémentaires. La suspension est centrifugée à 11000 rpm (4°C, 50 min), puis le culot de noyaux est repris dans 50 ml de tampon HAP (Phosphate de sodium 50 mM ; NaCl 0,6 M ; DTT 1 mM ; PMSF 0,2 mM). 80 g de résine d'Hydroxylapatite BioGel HPA (Biorad) ont été ajoutés, sous agitation, à la suspension. L'ensemble est coulé dans une colonne Biorad de 300 ml, et le surnageant est récupéré en sortie de colonne (il contient H1 partiellement purifié). La colonne est reliée à un détecteur spectroscopique mesurant la DO à 280 nm (absorption des protéines), puis elle est lavée avec 1,5 L de tampon HAP à une vitesse de 60 ml/h. Les octamères d'histones sont ensuite élués dans 16 ml de tampon HAP additionné de NaCl pour atteindre 2,5 M final. La pureté des histones est testée coloration au bleu de coomassie, et leur concentration mesurée par un dosage Bradford (Biorad).

Purification de protéines étiquetées sur colonne IMAC :

Un volume CV de résine TALON superflow (AP Biotech) est équilibré dans le tampon IMAC 0 (20 mM trisHCl pH 7,5 ; 250 mM NaCl ; 10% glycérol ; 2mM PMSF extemporanément ; 10 mM fluorure de sodium si nécessaire ; 2 mM orthovanadate de sodium si nécessaire ; 10 mM β-glycérophosphate si nécessaire), dans une colonne jetable ou un tube eppendorf. L'extrait protéique total contenant la (les) protéine(s) recombinantes portant une série d'histidines est ajouté, dilué selon sa concentration pour obtenir un volume d'incubation de 10 CV. La liaison par affinité est réalisée pendant 30 min à RT ou 1h à 4°C. La résine est alors lavée par 3 fois 10 CV de tampon IMAC 0, puis une élution par palier est faite : 2 fois 2 CV de tampon IMAC 0 contenant 50 mM d'imidazole, puis 2 fois 2 CV de tampon IMAC 0 à 100 mM d'imidazole, en enfin 2 fois 2 CV de tampon IMAC 0 à 200 mM d'imidazole.

I. Concentration, purification d'échantillons et analyse par spectrométrie de masse :

Concentration sur membrane d'échange Centricon :

Cette méthode a été utilisée pour concentrer un échantillon autant que pour échanger un tampon indésirable.

Les centricons (Amicon bioseparations) 10 kD, 30 kD et 100 kD ont été utilisés selon les recommandations du fabricant, mais avec quelques adaptations : Pour bloquer la membrane avant d'y ajouter l'échantillon, on dépose

est dans certains cas 2 ml de lait à 0,3% dans le réservoir du centricon et on le laisse ainsi 2h au froid. Puis il est lavé en faisant passé par centrifugation 3 fois 2 ml du tampon que l'on veut obtenir au final.

Dans le cas où l'échantillon contient une concentration importante de détergent, on tente de diminuer cette concentration avant passage sur la membrane en diluant avec un tampon sans détergent, et en concentrant l'échantillon par fractions successives.

Précipitation à l'acide trichloroacétique:

On ajoute à l'échantillon 1/10^{ème} de son volume de deoxycholate de sodium 1% w/v, et on mélange vigoureusement. Puis on ajoute 1/5 du volume obtenu d'acide trichloroacétique 50 %. La précipitation est laissée pour 30 à 60 min sur la glace, puis centrifugée à 15 000 rpm et 4°C pendant 20 min. Le surnageant est mis de côté et le culot lavé avec environ 1 ml d'acétone froide, puis incubé à nouveau 15 min sur la glace. Il est centrifugé comme ci-dessus, débarrassé de l'acétone et séché sur la pailleuse ou dans un évaporateur rotatif (speedvac). Le culot est resuspendu dans le tampon voulu.

Coloration à l'argent comptible avec la spectrométrie de masse:

Pour ce protocole, les bacs et éprouvettes doivent être en verre, propres, et les solutions préparées avec de l'eau ultrapure (MilliQ). Le gel de polyacrylamide est lavé très rapidement à l'eau MQ, puis fixé dans une solution 30% éthanol ; 5% acide acétique, pendant 3x 30 min ou 1h puis toute la nuit, à RT. 200 ml suffisent à chaque étape pour un gel 10/15 cm. Il est alors lavé 4x 10 min à l'eau MQ, puis sensibilisé dans une solution à 0,02% m/v de thiosulfate de sodium. 2 nouveaux lavages à l'eau pour 1 min sont réalisés, puis le gel est incubé dans la solution de coloration (2 g/l Nitrate d'argent, 0,028% formaldéhyde 37% à ajouter extemporanément) 30 à 45 min. Il est ensuite lavé très rapidement à l'eau MQ et incubé dans la solution de révélation (17,6 g/L de carbonate de sodium non hydraté ; 0,0025% thiosulfate de sodium, 0,028% formaldéhyde à ajouter extemporanément). Cette révélation doit se faire dans la mesure du possible à l'abri de la lumière, et son degré est à estimer visuellement.

L'arrêt de la coloration est réalisée par incubation dans la solution stop (tris 40 g/l ; 2% v/v acide acétique) pendant 30 à 60 min.

Coloration au zinc-imidazole :

Il s'agit d'une coloration négative, qui marque les zones pauvres en protéines.

Pour ce protocole, les bacs et éprouvettes doivent être en verre, propres, et les solutions préparées avec de l'eau ultrapure (MilliQ). Il est adapté pour un gel de protéine de 10-15 % d'acryl, et de 0,75 mm d'épaisseur.

Le gel est rapidement lavé dans l'eau MQ (30 s à 1 min), puis incubé 15 min dans une solution de coloration (0,2 M imidazole; 0,1 % de SDS). Après un nouveau lavage rapide à l'eau MQ, il est développé avec une solution à 0,2 M de sulfate de zinc, sous légère agitation (il est déconseillé de dépasser 1 min d'incubation, au risque de voir les protéines se colorer aussi). Le développement est arrêté en remplaçant la solution de sulfate de zinc par de l'eau MQ, et agitant une dizaine de minutes.

Si les spots de protéines doivent être soumis à une digestion enzymatique dans le gel, ils sont au préalable « décolorés » en les immergeant 10 min dans une solution chélatant le zinc (50 mM tris ; 200 mM glycine pH 8,3 ; 30 % acetonitrile), puis lavés deux fois avec une solution tris 50 mM pH 8,3 avant de procéder aux lavages classiques de digestion dans le gel.

Digestion de protéine dans le gel :

L'ensemble des opérations suivantes est réalisé dans une pièce « blanche » et l'opérateur doit porter une blouse propre fermée à l'arrière, une charlotte, un masque et des gants. Tout le matériel (tips, verre, spatule) doit avoir été protégé du contact avec la peau, et si possible stérilisé. L'eau et les solvants doivent être ultrapurs.

Les bandes ou spots de gel SDS PAGE sont placés dans des tubes Eppendorf et lavés successives par deux solutions alternées, (volume à évaluer de façon à largement immerger les bandes) : première solution 25 mM carbonate d'ammonium, puis agitation 5 min sur un vortex à plateau, puis deuxième solution acetonitrile, puis agitation 5 min sur un vortex à plateau. Cette routine est répétée 3 fois. Le reste d'acetonitrile du dernier lavage est éliminé par évaporateur rotatif (speedvac) pendant 10 min. La bande est alors incubée dans une solution de réduction (10 mM Dithiothreitol dans 25 mM carbonate d'ammonium) pendant 1h à 57°C. La solution de réduction est alors

remplacée par une solution d'alkylation (55 mM Iodoacétamide dans 25 mM carbonate d'ammonium) pour une nouvelle incubation d'1h à RT et à l'obscurité.

Après cela, la bande ou le spot est soumis à nouveau à trois cycles de lavages identiques aux précédents, puis séché dans un évaporateur rotatif pendant 10 min. On ajoute alors une solution de digestion (trypsine à 12,5 ng/μl dans 25 mM carbonate d'ammonium), de façon à réhydrater complètement le gel et le couvrir, sans pour autant être en excès. L'état de réhydratation doit être vérifié 20 min après l'ajout de la solution de digestion. La digestion est laissée pendant 12 à 16h (une nuit) à 37°C.

Les peptides résultants de la digestion enzymatique sont extraits du gel par l'ajout d'acétonitrile de façon à atteindre une concentration sur le gel de 30%, et sonication pendant 15 min. Le surnageant est récupéré et remplacé par une solution à 60% d'acétonitrile pour une seconde extraction de 15 min par sonication. Les deux fractions sont regroupées et concentrées dans un évaporateur rotatif avant d'être analysé en MALDI-TOF ou ESI-IT.

Concentration dessalage de mélange peptidique sur micro-colonne de phase inverse (ZIPTIPC18, Millipore) :

On utilise de l'eau ultrapure pour ce protocole.

Un mélange peptidique de quelques μl, contenant des sels et/ou détergents est tout d'abord additionné d'acide trifluoroacétique qsp 0,1% final, sans dépasser 10 μl. Un cône zip-tip est équilibré par aspiration d'une solution d'acétonitrile à 50%, puis 3 à 4 aspirations de 0,1% acide trifluoroacétique. Les peptides sont fixés sur le zip-tip par 5 à 10 cycles aspiration /rejet du mélange. Le cône est alors lavé par une autre série de cycles aspiration/rejet d'une solution 0,1% acide trifluoroacétique. Indépendamment, 2 à 4 μl de 50% acétonitrile sont distribués dans un tube pour chaque échantillon. L'élution des peptides dessalés se fait par aspiration/rejet de cette solution, qui peut alors être analysée en MALDI-TOF ou ESI-IT.

Acquisition de spectres MALDI-TOF :

Les analyses de protéine mentionnées ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse REFLEX IV (Bruker Daltonics), et des logiciels XMASS, XTOF et FLEXANALYSIS (Bruker Daltonics). Les matrices organiques l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) et l'acide dihydroxybenzoïque (DHB) proviennent de la société (Fluka ou Sigma). Les dépôts ont été fait sur une cible SCOUT 384 (Bruker Daltonics).

Dépôt sandwich :

Cette méthode n'est compatible qu'avec la CHCA, insoluble dans l'eau. Deux solutions de matrice sont préparées : 1 = solution saturée dans l'acétone, 2 = solution à 10 mg/ml dans 50% acétonitrile. 0,5 μl de matrice 1 est déposée sur la plaque cible, et séchée à l'air libre. On dépose alors dessus 0,5 μl de 5% acide formique, puis 0,5 μl d'échantillon. Avant que ce dernier dépôt ne soit évaporé, on le couvre par 0,5 μl de solution de matrice 2. Le dépôt complet est séché à l'air libre ou dans une cloche à vide pendant 5 min. S'il présente un excès de sels, le spot est lavé en déposant dessus une goutte (1 μl) de 5% acide formique, qui est ré-aspirée, ou chassée à l'aide d'une poire.

Dépôt goutte séchée :

Une solution de matrice à 10 mg/ml dans de l'acétonitrile à 50 est préparée. Sur la plaque cible du spectromètre, 0,5 μl d'échantillon est déposé est mélangé à 0,5 μl de solution de matrice. Ce dépôt est séché à l'air libre ou sous une cloche à vide. Dans le cas de la matrice CHCA, un lavage à l'acide formique peut être effectué comme décrit ci-dessus.

Les échantillons présentés dans ce travail ont été analysés majoritairement en mode positif, dans une configuration réflectron. La source d'ions est paramétrée dans les conditions suivantes : fluence laser entre 15 et 20% pour la matrice CHCA, 35 à 40% pour la DHB ; tensions : IS1 20 kV IS2 17,2 kV Lens 9 kV Reflector 23 kV ; délai d'extraction de 400 ns ; suppression des masses inférieures à 800 Da.

La calibration externe en masse est réalisée à l'aide d'un mélange de peptides synthétiques : angiotensine 1046,54 Da ; Substance P 1348,72 Da ; Bombesine 1620,80 ; Unknown 2004,94 ; ACTH 2465,47. Dans certains cas, les peptides d'autodigestion de la trypsine été utilisés pour une calibration interne (842,51 et 2211,11).

Acquisition de spectre MALDI-TOF-TOF :

Afin d'obtenir la séquence en acides aminés de peptides intéressants (projet H3), un dépôt goutte séchée est réalisé avec un matrice CHCA ultrapure (méthode du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique de Strasbourg). Celle-ci est diluée à saturation dans de l'acétonitrile 50% et le surnageant de cette dilution est lui-même

diluée 3 fois dans de l'acétonitrile à 70 % pour obtenir la fraction à utiliser. Le dépôt est réalisé sur une cible SCOUT et analysé en mode positif, dans un appareil ULTRAFLEX (Bruker-Franzen analytic GmbH, Bremen, Germany), commandé par le logiciel Flexcontrol 2.0. L'ionisation est due à l'irradiation du dépôt par un laser à azote de longueur d'onde 337 nm et de fréquence de tir de 10 à 20 Hz. Sa puissance est modulée entre 150 et 200 μ J. Une acquisition représente en général plus de 100 tirs accumulés pour réduire le rapport signal sur bruit. La source d'ionisation est paramétrée de la façon suivante: IS1 : 20 kV, IS2 : 17,5 kV, lens 21 kV ; délai d'extraction : 400 ns. L'acquisition du spectre MS est faite à l'aide d'une tension d'accélération maximale de 25 kV. Les ions de fragmentation sont obtenus par décomposition induite par laser (LID : laser induced decomposition) d'un ion précurseur sélectionné dans le premier tube de vol. Dans ce cas, tous les ions précurseurs sont accélérés à 8 kV puis l'un est sélectionné et décomposé dans l'interface « timed ion gate ». Les fragments sont ré-accélérés par une tension de 19 kV dans l'interface LIFT, puis résolues dans le second tube de vol en mode réflecteur.

L'étalonnage externe de la gamme de masse est réalisé à l'aide d'un mélange de peptides synthétiques, car la protéase ArgC ne donne pas de peptide d'autolyse utilisable pour la calibration. Leurs masses sont les suivantes : 712,38 Da ; 1046,54 Da ; 1348,72 Da ; 1620,81 Da ; 2004, 95 Da.

Les fragments sont analysés à l'aide du logiciel Biotoools 2.2.

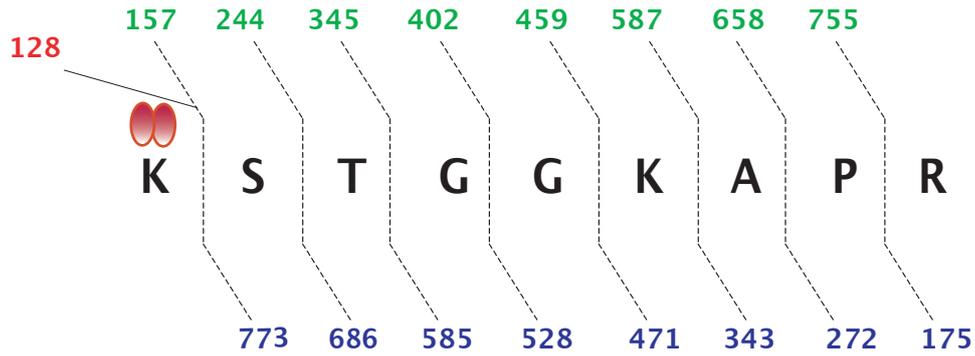
RECHERCHE PAR EMPREINTE PEPTIDIQUE DANS LES BANQUES DE DONNÉES DE PROTÉINES :

Les listes de masses peptidiques obtenues par MALDI sont soumises via les logiciels MSFit, Mascot et DeepView à une comparaison à des listes de masses peptidiques issues de digestion *in silico* des protéines des banques Swissprot et NCBI. Pour cela les paramètres sont les suivants : le plus souvent une seule protéine candidate est demandée, dans l'espèce dont est issu l'échantillon, ou cette espèce et les rongeurs (contaminants d'anticorps). Le point isoélectrique n'est pas précisé, mais on fixe une gamme de poids moléculaires en fonction de celui donnée par la position du spot sur le gel. Les modifications potentielles des peptides endogènes, ou dues au traitement du gel ne sont pas prises en compte, à l'exception de la modification par l'iodoacétamide des cystéines. Un minimum de 3 masses attribuées est requis pour retenir la protéine candidate, et une précision sur la masse de ces peptides de 30 à 50 ppm. Enfin, les masses sont soumises au moteur en tant que masses monoisotopiques chargées par un proton.

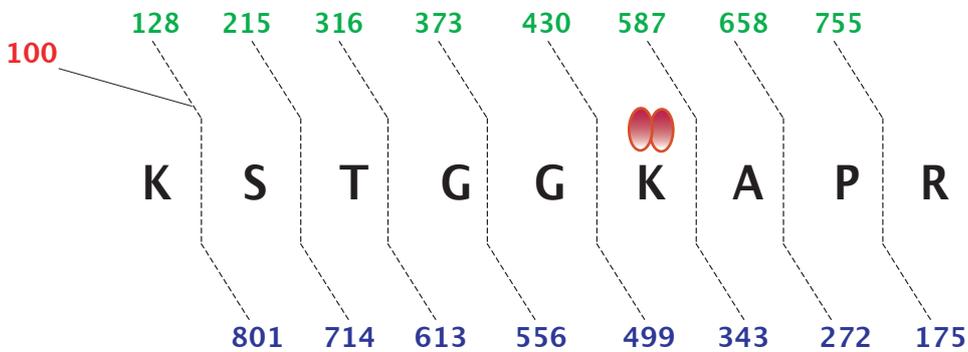
Une recherche systématique des peptides attribués aux kératines humaines est faite sur chaque échantillon pour minimiser les faux positifs.

En cas d'identification douteuse, la liste de masse est soumise avec la protéine candidate aux logiciels Findpep et Findmod (swissprot) pour élargir éventuellement le recouvrement de la séquence.

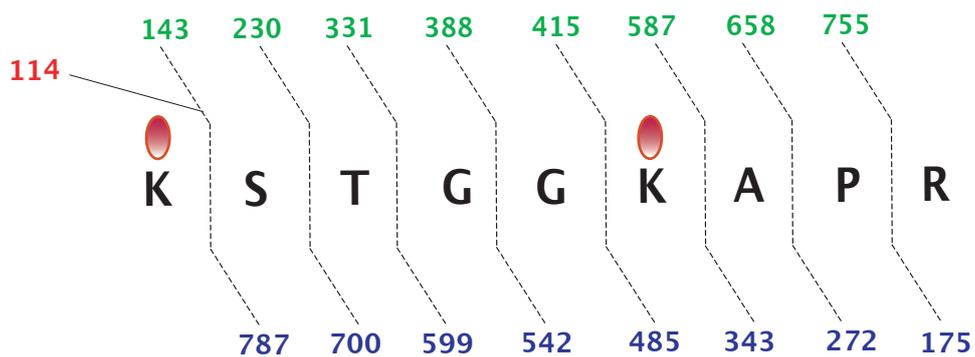
Annexe 1 : Schéma de fragmentation du peptide KSTGGKAPR d'H3



Diméthylation sur la lysine 9



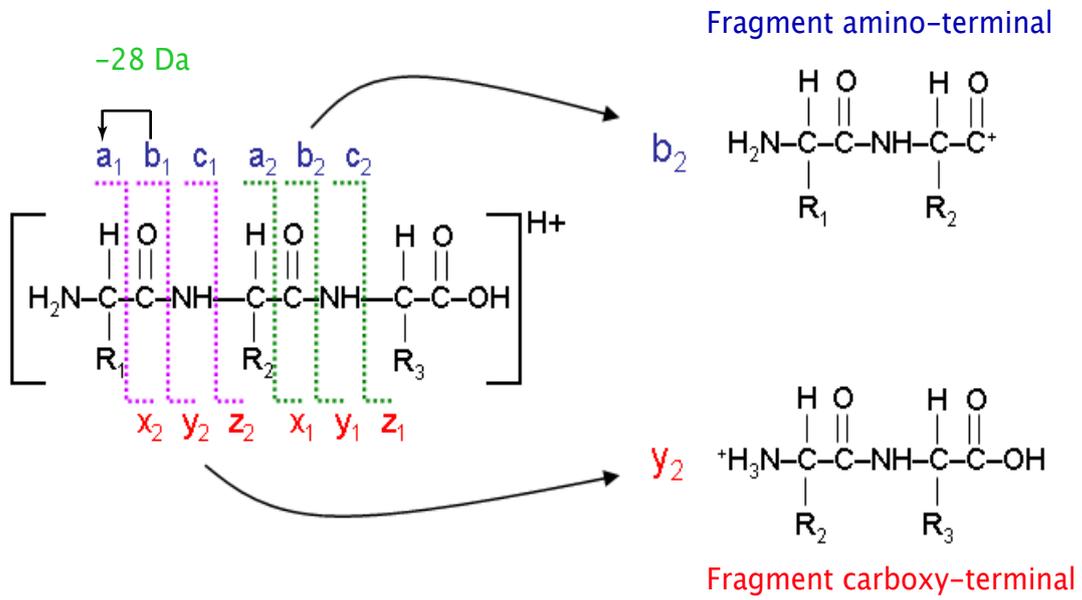
Diméthylation sur la lysine 14



Méthylation répartie entre la lysine 9 et la lysine 14

Les fragments de type b, où la charge est restée sur la partie amino-terminale, sont marqués en vert. Les fragments de type y, où la charge est restée sur la partie carboxy-terminale, sont marqués en bleu. Certains fragments de coupure atypique (a), intervenant avant le groupement CO, sont marqués en rouge. Les masses sont arrondies au dalton inférieur.

Annexe 2 : Principe de fragmentation peptidique en MS tandem



ANNEXE 3

Stratégie analytique appliquée à l'identification et la caractérisation de protéines par spectrométrie de masse.

Ces quelques paragraphes décrivent la démarche suivie lors de la préparation d'échantillons protéiques pour l'analyse par spectrométrie de masse (MS). Ils sont destinés à un expérimentateur peu au fait des méthodes et principes d'application de cette technique, et qui voudrait l'utiliser. Ayant rencontré quelques-uns des pièges qui lui sont spécifiques, je souhaite regrouper ici les informations utiles à cet expérimentateur, du moins dans le cadre de l'identification et la caractérisation de protéines et peptides.

Ces informations sont organisées selon le schéma de la figure jointe, de façon à être utilisées étape par étape pour établir un protocole. Il s'agit de définir la stratégie analytique à base de MS la mieux adaptée à la question posée (quelle protéine ? quelle modification ? quelle isoforme ?)

Notons tout d'abord, qu'un échantillon biologique préparé classiquement pour détecter des protéines par WB (ou des tests fonctionnels *in vitro*) n'est pas adapté à l'analyse par spectrométrie de masse. Il est généralement trop peu concentré. De plus, il contient le plus souvent des composés chimiques qui limitent l'ionisation ou la résolution des analytes (peptides dans notre cas). Ainsi dans l'optique d'une analyse par MS, des adaptations doivent intervenir dès la préparation biochimique de l'échantillon.

Par la suite, il convient de choisir les méthodes de séparation et de digestion des protéines, puis le spectromètre de masse le plus adapté.

Cette « stratégie » ne prétend pas décrire toutes les possibilités de l'analyse par spectrométrie de masse, ni l'utilisation de chaque type d'instrument. Au contraire, ce document doit être abordé comme une introduction et un guide dans le cas particulier de l'identification de protéines.

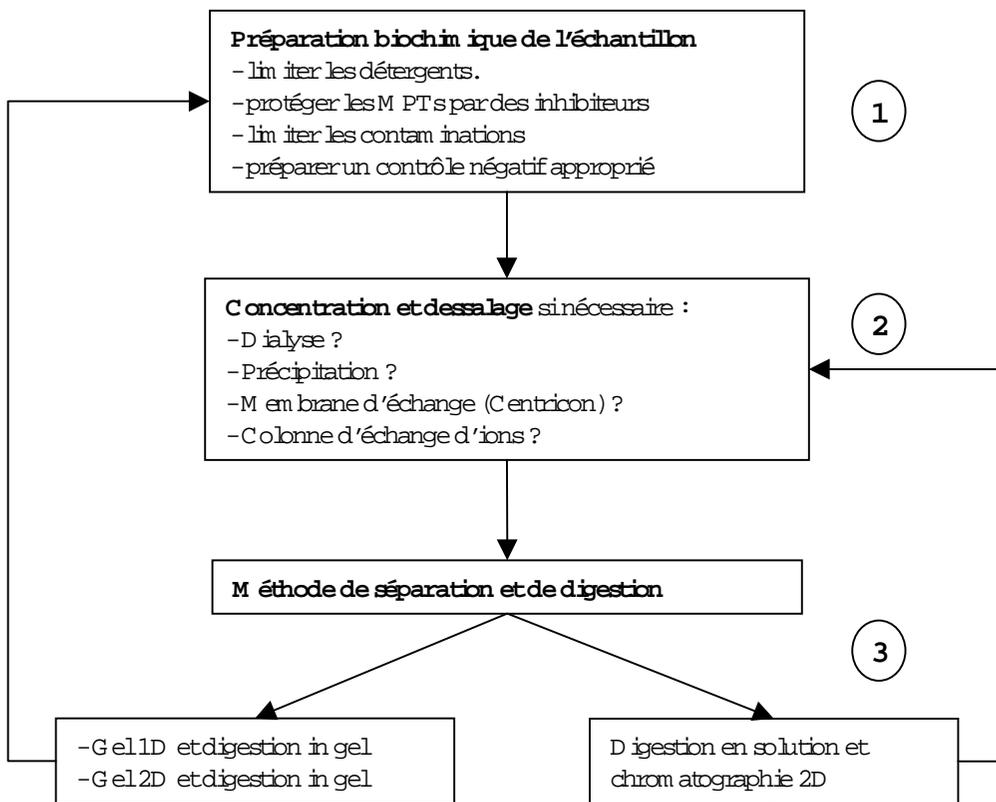
Les paragraphes ci-dessous sont numérotés en rapport avec les étapes décrites dans la figure jointe.

1. Préparation biochimique de l'échantillon.

Limiter la présence de détergent :

La présence de **détergent** dans l'échantillon final doit être restreinte au strict nécessaire. En effet, ces molécules polymériques de longueurs variables (dans un même produit) absorbent une grande part des charges destinées à l'analyte dans la source d'ions, et limitent l'ionisation de celui-ci (suppression de signal). De plus, dans l'analyseur, elles sont résolues comme d'autres espèces ioniques, et couvrent une très large gamme de masse. Par ailleurs, ce sont parmi les composés les plus difficiles à éliminer du tampon, *a posteriori*. Il est donc important de limiter leur introduction dès le début de la préparation de l'échantillon.

Annexe 3 :



Résolution sur **gel 1D** :

- Optimiser le gel (taille, pouvoir résolutif)

Résolution sur **gel 2D** :

- Adapter la concentration et le tampon
- Optimiser le gel et la migration

Digestion in gel :

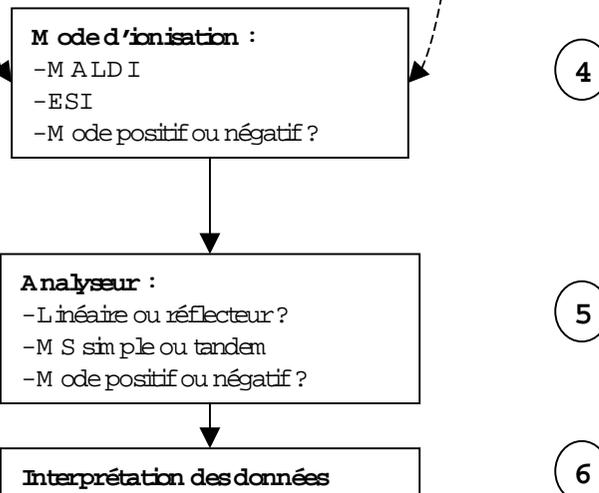
- Optimiser l'extraction des peptides
- Concentrer les peptides sur ZipTip ?

Digestion en solution :

- Adapter le tampon
- Optimiser le rapport enzyme/substrat

Chromatographie 2D :

- Optimiser les solvants et le gradient
- Couplage MS ou échantillonnage ?



Protéger les **modifications post-traductionnelles** :

Si le but d'une expérience est de détecter et localiser les modifications post-traductionnelles (MPT) d'une protéine, il est important de conserver celles-ci intactes au cours de la préparation. En effet, certaines modifications covalentes comme les phosphorylations et acétylations sont instables dès que l'on sort du contexte cellulaire. Des **inhibiteurs** appropriés (contre les dé-acétylases et phosphatases par exemple) doivent être introduits dans les tampons utilisés à toutes les étapes du protocole.

Limiter les **contaminations** :

L'autre problème majeur des analyses de protéines est la présence de protéines d'origine extérieure à l'échantillon. Elles peuvent provenir de l'atmosphère, de l'expérimentateur ou du matériel utilisé. Leur grande abondance suffit à rendre les contaminations problématiques car leur concentration dans un échantillon préparé sans précaution peut dépasser celle de l'analyte ! Dans l'identification de protéines inconnues, la présence de peptides issus de protéines contaminantes peut induire des erreurs d'identification importantes, ou même l'impossibilité de détecter les peptides de l'analyte, si les contaminants sont très majoritaires (effet de suppression).

Il est donc important de prendre **quelques précautions** pour éviter ces contaminations : le matériel utilisé est à usage unique et conservé, avant utilisation, à l'abri de l'air ambiant. S'il ne peut s'agir de matériel jetable, il doit être lavé précisément et rincé avec un solvant (méthanol, acétonitrile, acétone). D'autre part, la manipulation de l'échantillon durant les étapes de purification doit se faire avec des gants.

Préparer un **contrôle négatif** approprié :

La spectrométrie de masse, comme l'immunodétection, ne fait pas de différence entre une protéine spécifique à l'échantillon, et une autre introduite par accident, et sans intérêt pour la question biologique posée. Il est donc important de soumettre un contrôle négatif approprié au même protocole de préparation et d'analyse.

2. Concentration et dessalage éventuels :

Les échantillons d'origine biologiques, qu'il s'agisse de sucres, de protéines ou d'acides nucléiques, contiennent le plus souvent des composés incompatibles avec la spectrométrie de masse. C'est le cas des sels non volatils, des ions métalliques, des détergents, et de certains tampons, ajoutés durant la préparation pour protéger l'analyte ou maintenir des interactions.

Par ailleurs, les protéines ou peptides à analyser peuvent être dilués dans un grand volume : les concentrer peut augmenter les chances d'obtenir un résultat sans ambiguïté.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour les éliminer avant l'analyse par MS :

La **dialyse** est adaptée aux échantillons assez concentrés (protéines visibles sur un gel d'acrylamide coloré au bleu de Coomassie). Il est préférable de pré-incuber la membrane utilisée avec une solution riche en protéine (insuline, albumine) pour limiter l'absorption de l'échantillon.

Certaines méthodes de **précipitation** peuvent être utiles, pourvu que l'échantillon ne soit pas dilué. On préférera une précipitation à l'acétone ou à l'acide trichloroacétique, aux précipitations utilisant des sels.

Les **membranes d'échange** par centrifugation (de type Centricon, Palfiltron) sont adaptées aux échantillons assez dilués, et permettent de réduire largement le volume. C'est ce qui fait leur grand avantage sur les membranes de dialyse classique. Néanmoins, leur capacité à éliminer les sels, détergents et tampons sont du même ordre. La purification peut être plus rapide par cette méthode que par dialyse

passive, mais une attention particulière doit être portée au temps de centrifugation pour ne pas assécher l'échantillon.

Il existe aujourd'hui des **mini-colonnes échangeuses d'ion** qui peuvent aider à remplacer le tampon d'échantillons de petit volume (500 µl) (par exemple UNO-S de Biorad). Il faut s'assurer que l'ion relâché par la colonne est compatible avec la MS.

3. Méthode de séparation et de digestion

Une fois l'échantillon prêt pour l'analyse, il doit être digéré par une protéase pour produire des peptides de taille appropriée. Si plusieurs protéines sont présentes, l'analyse du spectre obtenu sera particulièrement ardue. Il est donc nécessaire de séparer les différentes protéines, ou les différents peptides afin de les soumettre séparément à une analyse MS. Ceci peut être fait selon **deux stratégies : séparation des protéines puis digestion, ou digestion des protéines puis séparation des peptides.**

Dans un cas, les protéines sont résolues sur un gel, puis chacune est excisée, et digérée dans le bout de gel qu'elle occupe. Le mélange de peptides produits est analysé pour obtenir une liste de masses, qui correspond à une, deux ou trois protéines (pour un gel peu résolutif).

Dans l'autre cas, l'ensemble des protéines présentes est digéré dans le même échantillon. Une analyse MS de celui-ci ne permet pas de distinguer les masses de peptides spécifiques à une protéine dans ce mélange très riche. Une approche alternative a été étudiée pour remplacer la résolution des protéines par gel d'acrylamide. Les peptides sont séparés successivement sur deux colonnes de chromatographie (en général l'une par échange d'ions, l'autre sur une phase inverse), puis analysés séparément en MS tandem. Le moyen utilisé dans ce cas pour identifier la protéine correspondant à chaque peptide est sa séquence en acides aminés, en non sa masse. Le fait de retrouver dans l'ensemble de l'analyse plusieurs peptides appartenant à une protéine est la preuve que l'identification n'est pas un artefact.

Ces deux approches sont complémentaires, et ont des particularités qui peuvent orienter le choix de l'une par rapport à l'autre.

Séparation sur Gel et digestion des protéines :

Gel 1D : la séparation en fonction du seul poids moléculaire est adaptée aux échantillons peu complexes (nombre de protéines limité). Il est important de choisir le pouvoir résolutif du gel en fonction de la gamme de masse attendue. Les gels gradients de 4% à 20% d'acrylamide permettent de séparer d'un coup des protéines réparties sur une large gamme de masse.

Gel 2D : Cette technique à l'avantage de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire et de leur potentiel d'ionisation (charge globale en milieu aqueux). Elle est donc recommandée pour les échantillons très riches, ou lorsque l'on veut séparer des isoformes ne différant que par la charge (différentes MPT par exemple). De plus, il est possible de choisir une gamme de pI spécifique aux protéines que l'on veut séparer. Cependant, la **mise au point** d'un gel 2D est coûteuse en temps et en matériel, et la résolution en deux dimensions entraîne une perte importante d'échantillon (jusqu'à 90 %). De plus, l'échantillon doit être dans des conditions de concentration et de tampon très particulières pour que la séparation sur gel 2D apporte un résultat intéressant (*Lilley et al., 2002 ; Shaw et Riederer, 2003*). Ceci impose une préparation particulière (dessalage, échange, précipitation...)

Digestion dans le gel : le premier paramètre à prendre en compte pour cette étape est la protéase. Ceci est valable aussi pour la digestion en solution (voir ci-dessous). Afin d'obtenir un recouvrement optimal de la séquence de la protéine, les peptides doivent être de taille moyenne (entre 5 et 25 aa par exemple). L'enzyme de digestion peut donc être choisie, si l'on connaît la (les) protéines étudiées, selon la répartition de ses sites de clivage dans la séquence. Si les substrats sont inconnus, la trypsine (qui coupent en carboxy-terminal des Lysines et Arginines) est en général adaptée.

Le défaut majeur de cette approche est la **réétention de peptides** dans les mailles d'acrylamide, après digestion. En effet, l'extraction réalisée n'est que très rarement totale, et ce paramètre limite le recouvrement de la protéine. Cependant, il est possible d'améliorer la quantitativité de l'extraction en adaptant les conditions (concentration de solvant et d'acides, répétition).

Après extraction, les peptides peuvent être concentrés à l'aide de micro-colonne de résine phase inverse (de type chromatographie HPLC, marques Ziptip ou Omix).

Digestion en solution puis séparation des peptides par chromatographie :

Cette méthode a un intérêt majeur : en théorie, l'ensemble des peptides peut être récupéré après digestion, ce qui n'est pas le cas de la digestion dans le gel. Elle est donc très utile si le recouvrement après une digestion dans le gel n'est pas suffisant. Cependant, elle demande d'adapter le tampon de l'échantillon pour favoriser l'activité de la protéase. Ceci doit être pris en compte dès l'étape 2 décrite dans la figure jointe. D'autre part, le rapport enzyme substrat doit être optimisé pour une digestion homogène des protéines plus ou moins abondantes.

Enfin, la digestion en solution d'un mélange de protéines (plus de 3) impose une séparation des peptides par chromatographie afin de simplifier les spectres. Si le mélange de protéines est très complexe, deux séparations successives sont nécessaires pour séparer individuellement tous les peptides (selon leur charge et leur hydrophobicité le plus souvent). Après cela, la mesure de la masse de chacun ne suffit pas à identifier une protéine, car il n'est plus possible d'attribuer une liste de masse à une protéine. Une **analyse MS tandem** pour obtenir la séquence est nécessaire. Les peptides ionisés sont fragmentés et résolus de façon à mesurer la masse de chacun (cf. Annexe 2). Les différences de masses permettent d'identifier les acides aminés, et donc de reconstruire la séquence de la protéine

4. Mode d'ionisation

Les deux modes d'ionisation les plus utilisés pour l'analyse d'échantillons biologiques sont le **MALDI** (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) et l'**ESI** (Electrospray Ionisation). La première permet d'ioniser les peptides en phase solide, dans un co-cristal avec une matrice organique. Dans la seconde, l'échantillon est envoyé sous forme de spray chargé dans une enceinte de vide progressive, où les ions se forment par désolvatation.

MALDI :

La source MALDI est particulière par le fait que chaque peptide reçoit une unique charge, ce qui donne des **spectres simples**. De plus, son utilisation en routine est rapide et simple. Cependant, l'introduction de l'échantillon sous forme solide ne permet pas de couplage direct avec une chromatographie liquide, et sa gamme de détection est limitée dans les petites masses. En effet, la matrice forme aussi des ions qui couvrent le spectre en dessous de 700 Da.

Par ailleurs, il faut noter que les phosphorylations sont des modifications post-traductionnelles très fragile qui se dégradent dans le Tube de vol (analyseur associé à une source MALDI). Le MALDI n'est donc pas un instrument conseillé pour leur analyse.

Enfin, des matrices organiques ont été développées pour différents usages, et il peut être utile d'en tester plusieurs (l'une peut favoriser un peptide que l'autre ne permettra pas de détecter), ainsi que de tester des conditions de dépôt variées (goutte séchée ou sandwich, voir Matériel et Méthodes).

ESI :

L'électrospray permet d'introduire l'échantillon sous forme liquide, même assez diluée. Un **couplage** direct avec la sortie d'une colonne de chromatographie, est donc possible, avec une adaptation de débit.

Chaque espèce, peptide ou protéine, ionisée dans une source ESI est porteuse de plusieurs charges et apparaît donc plusieurs fois sur le spectre de rapport m/z. Ceci complique l'analyse, mais permet d'analyser une gamme de masse virtuellement infinie.

Cette ionisation est très sensible aux sels, notamment ceux qui se volatilisent mal et forme des adduits avec les peptides. Ceci a pour conséquence un déplacement de la masse et fausse donc la mesure.

Enfin, notons que contrairement à la technique précédente, cette ionisation conserve les phosphorylations.

Mode positif ou négatif :

Une source d'ion peut créer des anions ou des cations suivant la différence de potentiel imposée. C'est aussi un paramètre important car, certains peptides ou certaines protéines auront plus d'affinité pour une charge négative qu'une charge positive (ou l'inverse) selon leur séquence. Ainsi, les peptides riches en acides aminés chargés négativement donnent plus facilement des anions. Leur analyse sera donc beaucoup plus efficace en mode négatif qu'en mode positif.

5. Choix de l'analyseur

L'analyseur de masse est la partie du spectromètre qui séparent, à partir de différents principes physiques, les ions présents dans le mélange, en fonction de leur rapport masse/charge. Les types d'analyseurs de masse sont nombreux. Et je ne détaillerai pas chacun ici, mais noterai que le choix d'un analyseur dépend de l'information que l'on veut récolter sur le peptide ou la protéine.

Par exemple, la fragmentation acide aminé par acide aminé est surtout pratiquée aujourd'hui sur des appareils hybrides dit Q-TOF (quadrupole-temps de vol). Si plusieurs cycles de fragmentation sont nécessaires pour obtenir des informations de séquence précises, une trappe ionique (IT) est plus appropriée (MS/MS/MS/MS...).

À l'inverse, le domaine du Temps de vol (TOF) et des quadrupoles (Q) est la mesure de masse simple, soit dans le cas qui nous intéresse, l'identification de protéine par enregistrement d'empreinte peptidique.

6. Et après ? **L'analyse des données.**

L'analyse d'un échantillon protéique par spectrométrie de masse donne des résultats sous **deux formes**, selon la démarche choisie.

D'une part, l'analyse d'une protéine séparée et digérée dans le gel par MS simple donne une liste de masses peptidiques. Le procédé est qualifié d'identification par **enregistrement d'une empreinte de masses peptidiques** (peptide mass fingerprinting) Cette liste soumise à un moteur de recherche est comparée à celles des protéines d'une banque en ligne (NCBI, Swissprot pour les plus utilisées). C'est la correspondance entre la liste de masses expérimentales et une liste de la banque qui va permettre au moteur de suggérer une protéine pour l'identification. Le résultat de l'analyse est donc une liste de protéines qui

pourraient être celle que l'échantillon contenait, classées par probabilité décroissante. La probabilité (ou le score) de chaque identification dépend de plusieurs critères, qu'il est nécessaire de vérifier pour s'assurer que la protéine proposée n'est pas un « faux positif ».

La **précision** sur chaque masse (masse expérimentale/masse théorique) :

Elle est fixée en général avant la soumission de la liste de masses. Une bonne identification est caractérisée par l'homogénéité de l'erreur sur les masses, et une erreur inférieure à 50 ppm (parties par million) pour un appareil bien calibré.

Le **nombre de peptides** :

Il est d'usage de considérer qu'une protéine est un bon candidat à partir de 4 masses peptidiques reconnus.

Le **recouvrement de la protéine** :

Les peptides auxquels sont attribuées les masses proposées doivent couvrir la séquence de façon homogène. Si ce n'est pas le cas, mais que le nombre de peptides reconnus est suffisant, la protéine identifiée peut être de la même famille que celle présente dans l'échantillon et possède un domaine commun qui est celui couvert par les peptides.

La gamme de **poids moléculaire** :

Lors de la résolution d'un mélange de protéines sur un gel d'acrylamide, il est possible d'évaluer le poids moléculaire de chacune. Cette information doit être utilisée dans la recherche par comparaison d'empreinte peptidique. En effet, un spectre de masse correspondant à la digestion d'une protéine d'apparemment 150 kD ne peut contenir les masses peptidiques d'une protéine de 60 kD.

L'ensemble de ces paramètres est pris en compte par le moteur de recherche pour attribuer un **score** à chaque protéine candidate. Pour le logiciel *Profound* par exemple, une identification peut être considérée comme vraie, si le score s'approche de 1, tandis que les autres candidats proposés ont des scores beaucoup plus faibles (0,3 et moins).

D'autre part, l'analyse par spectrométrie de masse **tandem**, qu'elle fasse suite à une chromatographie des peptides ou non, donne accès à la séquence en acides aminés de chaque peptide. Cette information permet d'aligner le peptide sur les séquences de protéines disponibles dans les banques, et d'identifier la protéine. De même que précédemment, certains paramètres sont importants pour décider si l'identification est crédible ou non.

Sachant qu'il existe des domaines très homologues au sein de **familles de protéines**, une identification est considérée comme vraie, si plusieurs peptides séquencés (3 au moins) peuvent être alignés sur la séquence de la protéine, avec une répartition homogène.

De même que précédemment, l'identification de chaque acide aminé (par la mesure de différences de masse) doit être faite avec une **erreur faible** (moins de 0,5 Da en général).

Un nombre important **d'autres paramètres** guide l'analyse de spectres de masse tandem (notamment le respect d'un schéma de fragmentation préférentiel). N'étant pas spécialiste, je ne souhaite pas les détailler ici. Notons cependant, qu'il est préférable de s'adresser à un expérimentateur qualifié pour analyser un spectre, plutôt que de tenter une interprétation douteuse, au risque de conclure une identification fautive de protéine, ou de passer à côté d'informations précieuses.

BIBLIOGRAPHIE

- Aasland, R., Stewart, A. F. et Gibson, T. (1996), "The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB". *Trends Biochem Sci* 21 (3): 87-8
- Abraham, R. T. (2001), "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases". *Genes Dev* 15 (17): 2177-96
- Abraham, R. T. (2004), "PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways". *DNA Repair (Amst)* 3 (8-9): 883-7
- Adair, G. M., Rolig, R. L., Moore-Faver, D., et al. (2000), "Role of ERCC1 in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination". *Embo J* 19 (20): 5552-61
- Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., et al. (2000), "Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter". *Cell* 103 (4): 667-78
- Agalioti, T., Chen, G. et Thanos, D. (2002), "Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene". *Cell* 111 (3): 381-92
- Akhtar, A. et Becker, P. B. (2000), "Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in Drosophila". *Mol Cell* 5 (2): 367-75
- Akhtar, A., Zink, D. et Becker, P. B. (2000), "Chromodomains are protein-RNA interaction modules". *Nature* 407 (6802): 405-9
- Albright, S. R. et Tjian, R. (2000), "TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas". *Gene* 242 (1-2): 1-13
- Alexeev, A., Mazin, A. et Kowalczykowski, S. C. (2003), "Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament". *Nat Struct Biol* 10 (3): 182-6
- Allard, S., Utley, R. T., Savard, J., et al. (1999), "NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p". *Embo J* 18 (18): 5108-19
- Allfrey, V. G., Faulkner, R. et Mirsky, A. E. (1964), "Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* 51: 786-94
- Allison, L. A., Wong, J. K., Fitzpatrick, V. D., et al. (1988), "The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II of Saccharomyces cerevisiae, Drosophila melanogaster, and mammals: a conserved structure with an essential function". *Mol Cell Biol* 8 (1): 321-9
- Ame, J. C., Spenlehauer, C. et de Murcia, G. (2004), "The PARP superfamily". *Bioessays* 26 (8): 882-93
- Amundson, S. A., Bittner, M., Meltzer, P., et al. (2001), "Induction of gene expression as a monitor of exposure to ionizing radiation". *Radiat Res* 156 (5 Pt 2): 657-61
- Anafi, M., Yang, Y. F., Barlev, N. A., et al. (2000), "GCN5 and ADA adaptor proteins regulate triiodothyronine/GRIP1 and SRC-1 coactivator-dependent gene activation by the human thyroid hormone receptor". *Mol Endocrinol* 14 (5): 718-32
- Andegeko, Y., Moyal, L., Mittelman, L., et al. (2001), "Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks". *J Biol Chem* 276 (41): 38224-30
- Andel, F., 3rd, Ladurner, A. G., Inouye, C., et al. (1999), "Three-dimensional structure of the human TFIID-IIA-IIB complex". *Science* 286 (5447): 2153-6

- Anderson, D. E., Trujillo, K. M., Sung, P., et al. (2001), "Structure of the Rad50 x Mre11 DNA repair complex from *Saccharomyces cerevisiae* by electron microscopy". *J Biol Chem* 276 (40): 37027-33
- Andrau, J. C., Van Oevelen, C. J., Van Teeffelen, H. A., et al. (2002), "Mot1p is essential for TBP recruitment to selected promoters during in vivo gene activation". *Embo J* 21 (19): 5173-83
- Angus-Hill, M. L., Dutnall, R. N., Tafrov, S. T., et al. (1999), "Crystal structure of the histone acetyltransferase Hpa2: A tetrameric member of the Gcn5-related N-acetyltransferase superfamily". *J Mol Biol* 294 (5): 1311-25
- Arabi, A., Wu, S., Ridderstrale, K., et al. (2005), "c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription". *Nat Cell Biol* 7 (3): 303-10
- Arany, Z., Newsome, D., Oldread, E., et al. (1995), "A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein". *Nature* 374 (6517): 81-4
- Araya, N., Hiraga, H., Kako, K., et al. (2005), "Transcriptional down-regulation through nuclear exclusion of EWS methylated by PRMT1". *Biochem Biophys Res Commun* 329 (2): 653-60
- Ard, P. G., Chatterjee, C., Kunjibettu, S., et al. (2002), "Transcriptional regulation of the mdm2 oncogene by p53 requires TRRAP acetyltransferase complexes". *Mol Cell Biol* 22 (16): 5650-61
- Armache, K. J., Kettenberger, H. et Cramer, P. (2003), "Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (12): 6964-8
- Assenmacher, N. et Hopfner, K. P. (2004), "MRE11/RAD50/NBS1: complex activities". *Chromosoma* 113 (4): 157-66
- Ayyanathan, K., Lechner, M. S., Bell, P., et al. (2003), "Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation". *Genes Dev* 17 (15): 1855-69
- Baek, S. H., Ohgi, K. A., Rose, D. W., et al. (2002), "Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein". *Cell* 110 (1): 55-67
- Bakkenist, C. J. et Kastan, M. B. (2003), "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation". *Nature* 421 (6922): 499-506
- Balasubramanian, R., Pray-Grant, M. G., Selleck, W., et al. (2002), "Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation". *J Biol Chem* 277 (10): 7989-95
- Baldeyron, C., Jacquemin, E., Smith, J., et al. (2002), "A single mutated BRCA1 allele leads to impaired fidelity of double strand break end-joining". *oncogene* 21 (9): 1401-10
- Ball, L. J., Murzina, N. V., Broadhurst, R. W., et al. (1997), "Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1". *Embo J* 16 (9): 2473-81
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., et al. (2001), "Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain". *Nature* 410 (6824): 120-4
- Barber, C. M., Turner, F. B., Wang, Y., et al. (2004), "The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved". *Chromosoma* 112 (7): 360-71
- Barlev, N. A., Candau, R., Wang, L., et al. (1995), "Characterization of physical interactions of the putative transcriptional adaptor, ADA2, with acidic activation domains and TATA-binding protein". *J Biol Chem* 270 (33): 19337-44
- Barlev, N. A., Poltoratsky, V., Owen-Hughes, T., et al. (1998), "Repression of GCN5 histone acetyltransferase activity via bromodomain-mediated binding and phosphorylation by the Ku-DNA-dependent protein kinase complex". *Mol Cell Biol* 18 (3): 1349-58

- Barlev, N. A., Emelyanov, A. V., Castagnino, P., et al. (2003), "A novel human Ada2 homologue functions with Gcn5 or Brg1 to coactivate transcription". *Mol Cell Biol* 23 (19): 6944-57
- Bartfai, R., Balduf, C., Hilton, T., et al. (2004), "TBP2, a Vertebrate-Specific Member of the TBP Family, Is Required in Embryonic Development of Zebrafish". *Curr Biol* 14 (7): 593-8
- Bartolomei, M. S., Halden, N. F., Cullen, C. R., et al. (1988), "Genetic analysis of the repetitive carboxyl-terminal domain of the largest subunit of mouse RNA polymerase II". *Mol Cell Biol* 8 (1): 330-9
- Basehoar, A. D., Zanton, S. J. et Pugh, B. F. (2004), "Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes". *Cell* 116 (5): 699-709
- Baumann, P. et West, S. C. (1998), "DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts". *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (24): 14066-70
- Becker, P. B. et Horz, W. (2002), "ATP-dependent nucleosome remodeling". *Annu Rev Biochem* 71: 247-73
- Bell, B. et Tora, L. (1999), "Regulation of gene expression by multiple forms of TFIID and other novel TAFII-containing complexes". *Exp Cell Res* 246 (1): 11-9
- Bell, B., Scheer, E. et Tora, L. (2001), "Identification of hTAF(II)80 delta links apoptotic signaling pathways to transcription factor TFIID function". *Mol Cell* 8 (3): 591-600
- Benecke, A., Gaudon, C., Garnier, J. M., et al. (2002), "ADA3-containing complexes associate with estrogen receptor alpha". *Nucleic Acids Res* 30 (11): 2508-14
- Berger, S. L., Pina, B., Silverman, N., et al. (1992), "Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains". *Cell* 70 (2): 251-65
- Bertolotti, A., Melot, T., Acker, J., et al. (1998), "EWS, but not EWS-FLI-1, is associated with both TFIID and RNA polymerase II: interactions between two members of the TET family, EWS and hTAFII68, and subunits of TFIID and RNA polymerase II complexes". *Mol Cell Biol* 18 (3): 1489-97
- Bhaumik, S. R. et Green, M. R. (2001), "SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p". *Genes Dev* 15 (15): 1935-45
- Bhaumik, S. R., Raha, T., Aiello, D. P., et al. (2004), "In vivo target of a transcriptional activator revealed by fluorescence resonance energy transfer". *Genes Dev* 18 (3): 333-43
- Bird, A. W., Yu, D. Y., Pray-Grant, M. G., et al. (2002), "Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair". *Nature* 419 (6905): 411-5
- Bittner, C. B., Zeisig, D. T., Zeisig, B. B., et al. (2004), "Direct physical and functional interaction of the NuA4 complex components Yaf9p and Swc4p". *Eukaryot Cell* 3 (4): 976-83
- Blackwood, E. M. et Kadonaga, J. T. (1998), "Going the distance: a current view of enhancer action". *Science* 281 (5373): 61-3
- Bochar, D. A., Wang, L., Beniya, H., et al. (2000), "BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer". *Cell* 102 (2): 257-65
- Bondarenko, V. A., Liu, Y. V., Jiang, Y. I., et al. (2003), "Communication over a large distance: enhancers and insulators". *Biochem Cell Biol* 81 (3): 241-51
- Borrow, J., Stanton, V. P., Jr., Andresen, J. M., et al. (1996), "The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein". *Nat Genet* 14 (1): 33-41
- Bosotti, R., Isacchi, A. et Sonhammer, E. L. (2000), "FAT: a novel domain in PIK-related kinases". *Trends Biochem Sci* 25 (5): 225-7

- Bouazoune, K., Mitterweiger, A., Langst, G., et al. (2002), "The dMi-2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization". *Embo J* 21 (10): 2430-40
- Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., et al. (2001), "Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter". *Genes Dev* 15 (16): 2042-7
- Boudreau, A. A., Cronier, D., Selleck, W., et al. (2003), "Yeast enhancer of polycomb defines global Esal-dependent acetylation of chromatin". *Genes Dev* 17 (11): 1415-28
- Bowen, N. J., Fujita, N., Kajita, M., et al. (2004), "Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes". *Biochim Biophys Acta* 1677 (1-3): 52-7
- Boyer, L. A., Langer, M. R., Crowley, K. A., et al. (2002), "Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes". *Mol Cell* 10 (4): 935-42
- Boyer, L. A., Latek, R. R. et Peterson, C. L. (2004), "The SANT domain: a unique histone-tail-binding module?" *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (2): 158-63
- Bradbury, J. M. et Jackson, S. P. (2003), "The complex matter of DNA double-strand break detection". *Biochem Soc Trans* 31 (Pt 1): 40-4
- Brady, M. E., Ozanne, D. M., Gaughan, L., et al. (1999), "Tip60 is a nuclear hormone receptor coactivator". *J Biol Chem* 274 (25): 17599-604
- Brand, M., Leurent, C., Mallouh, V., et al. (1999a), "Three-dimensional structures of the TAFII-containing complexes TFIID and TFIIIC". *Science* 286 (5447): 2151-3
- Brand, M., Yamamoto, K., Staub, A., et al. (1999b), "Identification of TATA-binding protein-free TAFII-containing complex subunits suggests a role in nucleosome acetylation and signal transduction". *J Biol Chem* 274 (26): 18285-9
- Brand, M., Moggs, J. G., Oulad-Abdelghani, M., et al. (2001), "UV-damaged DNA-binding protein in the TFIIIC complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation". *Embo J* 20 (12): 3187-96
- Brehm, A., Tufteland, K. R., Aasland, R., et al. (2004), "The many colours of chromodomains". *Bioessays* 26 (2): 133-40
- Brown, C. E., Lechner, T., Howe, L., et al. (2000), "The many HATs of transcription coactivators". *Trends Biochem Sci* 25 (1): 15-9
- Brown, C. E., Howe, L., Sousa, K., et al. (2001), "Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit". *Science* 292 (5525): 2333-7
- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., et al. (1996), "Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation". *Cell* 84 (6): 843-51
- Brunkhorst, A., Neuman, T., Hall, A., et al. (2004), "Novel isoforms of the TFIID subunit TAF4 modulate nuclear receptor-mediated transcriptional activity". *Biochem Biophys Res Commun* 325 (2): 574-9
- Bryans, M., Valenzano, M. C. et Stamato, T. D. (1999), "Absence of DNA ligase IV protein in XR-1 cells: evidence for stabilization by XRCC4". *Mutat Res* 433 (1): 53-8
- Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., et al. (1989), "Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II". *Cell* 56 (4): 549-61
- Burke, T. W., Willy, P. J., Kutach, A. K., et al. (1998), "The DPE, a conserved downstream core promoter element that is functionally analogous to the TATA box". *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63: 75-82

- Burley, S. K. et Roeder, R. G. (1996), "Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID)". *Annu Rev Biochem* 65: 769-99
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., et al. (2001), "ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks". *J Biol Chem* 276 (45): 42462-7
- Buscemi, G., Savio, C., Zannini, L., et al. (2001), "Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage". *Mol Cell Biol* 21 (15): 5214-22
- Buschmann, T., Lin, Y., Aithmitti, N., et al. (2001), "Stabilization and activation of p53 by the coactivator protein TAFII31". *J Biol Chem* 276 (17): 13852-7
- Bushnell, D. A. et Kornberg, R. D. (2003), "Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: implications for the initiation of transcription". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (12): 6969-73
- Cai, Y., Jin, J., Tomomori-Sato, C., et al. (2003), "Identification of new subunits of the multiprotein mammalian TRRAP/TIP60-containing histone acetyltransferase complex". *J Biol Chem* 278 (44): 42733-6
- Cai, Y., Jin, J., Florens, L., et al. (2005), "The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes". *J Biol Chem*:
- Campbell, R. B., Sinclair, D. A., Couling, M., et al. (1995), "Genetic interactions and dosage effects of Polycomb group genes of *Drosophila*". *Mol Gen Genet* 246 (3): 291-300
- Canman, C. E., Lim, D. S., Cimprich, K. A., et al. (1998), "Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53". *Science* 281 (5383): 1677-9
- Cao, X. et Sudhof, T. C. (2001), "A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60". *Science* 293 (5527): 115-20
- Carney, J. P., Maser, R. S., Olivares, H., et al. (1998), "The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response". *Cell* 93 (3): 477-86
- Carrozza, M. J., Utley, R. T., Workman, J. L., et al. (2003), "The diverse functions of histone acetyltransferase complexes". *Trends Genet* 19 (6): 321-329
- Caspari, T. (2000), "How to activate p53". *Curr Biol* 10 (8): R315-7
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M. J., et al. (2003), "Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks". *Nat Cell Biol* 5 (7): 675-9
- Ceol, C. J. et Horvitz, H. R. (2004), "A new class of *C. elegans* synMuv genes implicates a Tip60/NuA4-like HAT complex as a negative regulator of Ras signaling". *Dev Cell* 6 (4): 563-76
- Champagne, N., Bertos, N. R., Pelletier, N., et al. (1999), "Identification of a human histone acetyltransferase related to monocytic leukemia zinc finger protein". *J Biol Chem* 274 (40): 28528-36
- Champagne, N., Pelletier, N. et Yang, X. J. (2001), "The monocytic leukemia zinc finger protein MOZ is a histone acetyltransferase". *Oncogene* 20 (3): 404-9
- Chan, D. W., Chen, B. P., Prithivirajasingh, S., et al. (2002), "Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks". *Genes Dev* 16 (18): 2333-8
- Chang, W. H. et Kornberg, R. D. (2000), "Electron crystal structure of the transcription factor and DNA repair complex, core TFIID". *Cell* 102 (5): 609-13
- Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M., et al. (2001), "Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files". *Science* 294 (5548): 1866-70
- Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., et al. (1997), "Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300". *Cell* 90 (3): 569-80

- Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., et al. (2001a), "Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes". *Mol Cell* 8 (5): 1105-15
- Chen, S., Inamdar, K. V., Pfeiffer, P., et al. (2001b), "Accurate in vitro end joining of a DNA double strand break with partially cohesive 3'-overhangs and 3'-phosphoglycolate termini: effect of Ku on repair fidelity". *J Biol Chem* 276 (26): 24323-30
- Chen, Z. et 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 (14): 5064-76
- Cheong, N., Perrault, A. R., Wang, H., et al. (1999), "DNA-PK-independent rejoining of DNA double-strand breaks in human cell extracts in vitro". *Int J Radiat Biol* 75 (1): 67-81
- Choi, C. H., Hiromura, M. et Usheva, A. (2003), "Transcription Factor IIB acetylates itself to regulate transcription". *Nature* 424: 965-969
- Choy, J. S., Tobe, B. T., Huh, J. H., et al. (2001), "Yng2p-dependent NuA4 histone H4 acetylation activity is required for mitotic and meiotic progression". *J Biol Chem* 276 (47): 43653-62
- Choy, J. S. et Kron, S. J. (2002), "NuA4 subunit Yng2 function in intra-S-phase DNA damage response". *Mol Cell Biol* 22 (23): 8215-25
- Clarke, A. S., Lowell, J. E., Jacobson, S. J., et al. (1999), "Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression". *Mol Cell Biol* 19 (4): 2515-26
- Coin, F. et Egly, J. M. (1998), "Ten years of TFIIF". *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63: 105-10
- Connelly, J. C. et Leach, D. R. (2002), "Tethering on the brink: the evolutionarily conserved Mre11-Rad50 complex". *Trends Biochem Sci* 27 (8): 410-8
- Corona, D. F., Clapier, C. R., Becker, P. B., et al. (2002), "Modulation of ISWI function by site-specific histone acetylation". *EMBO Rep* 3 (3): 242-7
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., et al. (2001), "ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling". *Science* 294 (5547): 1713-6
- Cosma, M. P., Tanaka, T. et Nasmyth, K. (1999), "Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter". *Cell* 97 (3): 299-311
- Cosma, M. P. (2002), "Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation". *Mol Cell* 10 (2): 227-36
- Costanzo, A., Merlo, P., Pediconi, N., et al. (2002), "DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes". *Mol Cell* 9 (1): 175-86
- Costanzo, V., Paull, T., Gottesman, M., et al. (2004), "Mre11 assembles linear DNA fragments into DNA damage signaling complexes". *PLoS Biol* 2 (5): E110
- Cote, J., Utey, R. T. et Workman, J. L. (1993), "Basic analysis of transcription factor binding to nucleosomes". *Methods in Molecular genetics* 6: 108-128
- Cote, J., Quinn, J., Workman, J. L., et al. (1994), "Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex". *Science* 265 (5168): 53-60
- Cramer, P. (2004), "RNA polymerase II structure: from core to functional complexes". *Curr Opin Genet Dev* 14 (2): 218-26
- Crick, F. (1979), "Split genes and RNA splicing". *Science* 204 (4390): 264-71

- Criswell, T., Leskov, K., Miyamoto, S., et al. (2003), "Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation". *Oncogene* 22 (37): 5813-27
- Crowley, T. E., Hoey, T., Liu, J. K., et al. (1993), "A new factor related to TATA-binding protein has highly restricted expression patterns in *Drosophila*". *Nature* 361 (6412): 557-61
- D'Amours, D. et Jackson, S. P. (2002), "The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling". *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (5): 317-27
- Daniel, J. A., Torok, M. S., Sun, Z. W., et al. (2004), "Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription". *J Biol Chem* 279 (3): 1867-71
- Das, B. K., Xia, L., Palandjian, L., et al. (1999), "Characterization of a protein complex containing spliceosomal proteins SAPs 49, 130, 145, and 155". *Mol Cell Biol* 19 (10): 6796-802
- Dasso, M., Dimitrov, S. et Wolffe, A. P. (1994), "Nuclear assembly is independent of linker histones". *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (26): 12477-81
- Davidson, I., Martianov, I. et Viville, S. (2004), "[TBP, a universal transcription factor?]" *Med Sci (Paris)* 20 (5): 575-9
- de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D. C., et al. (2001), "Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends". *Mol Cell* 8 (5): 1129-35
- de la Barre, A. E., Angelov, D., Molla, A., et al. (2001), "The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation". *Embo J* 20 (22): 6383-93
- de la Cruz, X., Lois, S., Sanchez-Molina, S., et al. (2005), "Do protein motifs read the histone code?" *Bioessays* 27 (2): 164-75
- De La Fuente, R., Viveiros, M. M., Wigglesworth, K., et al. (2004), "ATRX, a member of the SNF2 family of helicase/ATPases, is required for chromosome alignment and meiotic spindle organization in metaphase II stage mouse oocytes". *Dev Biol* 272 (1): 1-14
- Dey, A., Ellenberg, J., Farina, A., et al. (2000), "A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G(2)-to-M transition". *Mol Cell Biol* 20 (17): 6537-49
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., et al. (2003), "The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (15): 8758-63
- Dong, Z., Zhong, Q. et Chen, P. L. (1999), "The Nijmegen breakage syndrome protein is essential for Mre11 phosphorylation upon DNA damage". *J Biol Chem* 274 (28): 19513-6
- Downs, J. A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., et al. (2004), "Binding of Chromatin-Modifying Activities to Phosphorylated Histone H2A at DNA Damage Sites". *Mol Cell* 16 (6): 979-90
- Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W. S., et al. (2004), "Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans". *Mol Cell Biol* 24 (5): 1884-96
- Dugan, K. A., Wood, M. A. et Cole, M. D. (2002), "TIP49, but not TRRAP, modulates c-Myc and E2F1 dependent apoptosis". *Oncogene* 21 (38): 5835-43
- Durocher, D. et Jackson, S. P. (2001), "DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?" *Curr Opin Cell Biol* 13 (2): 225-31
- Dvir, A., Conaway, J. W. et Conaway, R. C. (2001), "Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II". *Curr Opin Genet Dev* 11 (2): 209-14
- Eberharter, A., Sterner, D. E., Schieltz, D., et al. (1999), "The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol Cell Biol* 19 (10): 6621-31

- Ebright, R. H. (2000), "RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II". *J Mol Biol* 304 (5): 687-98
- Egly, J. M. (2001), "The 14th Datta Lecture. TFIIF: from transcription to clinic". *FEBS Lett* 498 (2-3): 124-8
- Eisen, A., Utley, R. T., Nourani, A., et al. (2001), "The yeast NuA4 and Drosophila MSL complexes contain homologous subunits important for transcription regulation". *J Biol Chem* 276 (5): 3484-91
- Emami, K. H., Navarre, W. W. et Smale, S. T. (1995), "Core promoter specificities of the Sp1 and VP16 transcriptional activation domains". *Mol Cell Biol* 15 (11): 5906-16
- Evans, R., Fairley, J. A. et Roberts, S. G. (2001), "Activator-mediated disruption of sequence-specific DNA contacts by the general transcription factor TFIIB". *Genes Dev* 15 (22): 2945-9
- Fan, Q., An, L. et Cui, L. (2004a), "Plasmodium falciparum histone acetyltransferase, a yeast GCN5 homologue involved in chromatin remodeling". *Eukaryot Cell* 3 (2): 264-76
- Fan, W., Yanase, T., Wu, Y., et al. (2004b), "Protein kinase A potentiates adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor 1 transactivation by reintegrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, general control nonderepressed-5/transformation/transcription domain-associated protein, and suppressor, dosage-sensitive sex reversal-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells". *Mol Endocrinol* 18 (1): 127-41
- Fassler, J. S. et Winston, F. (1988), "Isolation and analysis of a novel class of suppressor of Ty insertion mutations in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genetics* 118 (2): 203-12
- Felinski, E. A. et Quinn, P. G. (2001), "The coactivator dTAF(II)110/hTAF(II)135 is sufficient to recruit a polymerase complex and activate basal transcription mediated by CREB". *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (23): 13078-83
- Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S. K., Celeste, A., et al. (2003), "H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis". *Dev Cell* 4 (4): 497-508
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., et al. (2004), "H2AX: the histone guardian of the genome". *DNA Repair (Amst)* 3 (8-9): 959-67
- Fischer, U., Heckel, D., Michel, A., et al. (1997), "Cloning of a novel transcription factor-like gene amplified in human glioma including astrocytoma grade I". *Hum Mol Genet* 6 (11): 1817-22
- Fischle, W., Wang, Y. et Allis, C. D. (2003), "Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond". *Nature* 425 (6957): 475-9
- Flinn, E. M., Wallberg, A. E., Hermann, S., et al. (2002), "Recruitment of Gcn5-containing complexes during c-Myc-dependent gene activation. Structure and function aspects". *J Biol Chem* 277 (26): 23399-406
- Foray, N., Marot, D., Gabriel, A., et al. (2003), "A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein". *Embo J* 22 (11): 2860-71
- Foster, F. M., Traer, C. J., Abraham, S. M., et al. (2003), "The phosphoinositide (PI) 3-kinase family". *J Cell Sci* 116 (Pt 15): 3037-40
- Frank, S. R., Schroeder, M., Fernandez, P., et al. (2001), "Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation". *Genes Dev* 15 (16): 2069-82
- Frank, S. R., Parisi, T., Taubert, S., et al. (2003), "MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin". *EMBO Rep* 4 (6): 575-80
- Fritsch, O., Benvenuto, G., Bowler, C., et al. (2004), "The INO80 protein controls homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*". *Mol Cell* 16 (3): 479-85

- Fu, M., Wang, C., Zhang, X., et al. (2004), "Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis". *Biochem Pharmacol* 68 (6): 1199-208
- Fuchs, M., Gerber, J., Drapkin, R., et al. (2001), "The p400 complex is an essential E1A transformation target". *Cell* 106 (3): 297-307
- Galarneau, L., Nourani, A., Boudreault, A. A., et al. (2000), "Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription". *Mol Cell* 5 (6): 927-37
- Game, J. C., Williamson, M. S. et Baccari, C. (2005), "X-ray survival characteristics and genetic analysis for nine *Saccharomyces* deletion mutants that show altered radiation sensitivity". *Genetics* 169 (1): 51-63
- Gangloff, Y. G., Werten, S., Romier, C., et al. (2000), "The human TFIID components TAF(II)135 and TAF(II)20 and the yeast SAGA components ADA1 and TAF(II)68 heterodimerize to form histone-like pairs". *Mol Cell Biol* 20 (1): 340-51
- Gangloff, Y. G., Romier, C., Thuault, S., et al. (2001), "The histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID". *Trends Biochem Sci* 26 (4): 250-7
- Gatei, M., Young, D., Cerosaletti, K. M., et al. (2000), "ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure". *Nat Genet* 25 (1): 115-9
- Gaughan, L., Brady, M. E., Cook, S., et al. (2001), "Tip60 is a co-activator specific for class I nuclear hormone receptors". *J Biol Chem* 276 (50): 46841-8
- Gaughan, L., Logan, I. R., Cook, S., et al. (2002), "Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor". *J Biol Chem* 277 (29): 25904-13
- Gaughan, L., Logan, I. R., Neal, D. E., et al. (2005), "Regulation of androgen receptor and histone deacetylase 1 by Mdm2-mediated ubiquitylation". *Nucleic Acids Res* 33 (1): 13-26
- Gavaravarapu, S. et Kamine, J. (2000), "Tip60 inhibits activation of CREB protein by protein kinase A". *Biochem Biophys Res Commun* 269 (3): 758-66
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., et al. (2002), "Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes". *Nature* 415 (6868): 141-7
- Gellert, M. (2002), "V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation". *Annu Rev Biochem* 71: 101-32
- Georgieva, S., Nabirochkina, E., Dilworth, F. J., et al. (2001), "The novel transcription factor e(y)2 interacts with TAF(II)40 and potentiates transcription activation on chromatin templates". *Mol Cell Biol* 21 (15): 5223-31
- Glass, C. K. et Rosenfeld, M. G. (2000), "The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors". *Genes Dev* 14 (2): 121-41
- Golding, S. E., Rosenberg, E., Khalil, A., et al. (2004), "Double strand break repair by homologous recombination is regulated by cell cycle-independent signaling via ATM in human glioma cells". *J Biol Chem* 279 (15): 15402-10
- Goodman, R. H. et Smolik, S. (2000), "CBP/p300 in cell growth, transformation, and development". *Genes Dev* 14 (13): 1553-77
- Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., et al. (1999), "Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation". *J Biol Chem* 274 (36): 25543-9
- Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E. A., et al. (2002), "Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation". *Genes Cells* 7 (1): 11-7
- Gray, H. B., Malmstrom, B. G. et Williams, R. J. (2000), "Copper coordination in blue proteins". *J Biol Inorg Chem* 5 (5): 551-9

- Greenblatt, J. (1991), "Roles of TFIID in transcriptional initiation by RNA polymerase II". *Cell* 66 (6): 1067-70
- Gregory, P. D., Schmid, A., Zavari, M., et al. (1999), "Chromatin remodelling at the PHO8 promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding". *Embo J* 18 (22): 6407-14
- Gronroos, E., Hellman, U., Heldin, C. H., et al. (2002), "Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination". *Mol Cell* 10 (3): 483-93
- Guarente, L. (1988), "UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals". *Cell* 52 (3): 303-5
- Guermah, M., Tao, Y. et Roeder, R. G. (2001), "Positive and negative TAF(II) functions that suggest a dynamic TFIID structure and elicit synergy with traps in activator-induced transcription". *Mol Cell Biol* 21 (20): 6882-94
- Gumbs, O. H., Campbell, A. M. et Weil, P. A. (2003), "High-affinity DNA binding by a Mot1p-TBP complex: implications for TAF-independent transcription". *Embo J* 22 (12): 3131-41
- Guo, Q. M., Malek, R. L., Kim, S., et al. (2000), "Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray". *Cancer Res* 60 (21): 5922-8
- Gurley, L. R., D'Anna, J. A., Barham, S. S., et al. (1978), "Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells". *Eur J Biochem* 84 (1): 1-15
- Haaf, T., Raderschall, E., Reddy, G., et al. (1999), "Sequestration of mammalian Rad51-recombination protein into micronuclei". *J Cell Biol* 144 (1): 11-20
- Hahn, S. (2004), "Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery". *Nat Struct Mol Biol* 11 (5): 394-403
- Hain, J., Reiter, W. D., Hudepohl, U., et al. (1992), "Elements of an archaeal promoter defined by mutational analysis". *Nucleic Acids Res* 20 (20): 5423-8
- Halkidou, K., Gnanapragasam, V. J., Mehta, P. B., et al. (2003), "Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development". *Oncogene* 22 (16): 2466-77
- Halkidou, K., Logan, I. R., Cook, S., et al. (2004), "Putative involvement of the histone acetyltransferase Tip60 in ribosomal gene transcription". *Nucleic Acids Res* 32 (5): 1654-65
- Hansen, J. C., Tse, C. et Wolffe, A. P. (1998), "Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye". *Biochemistry* 37 (51): 17637-41
- Harbour, J. W. et Dean, D. C. (2000), "The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms". *Genes Dev* 14 (19): 2393-409
- Hardy, E. et Castellanos-Serra, L. R. (2004), "Reverse-staining fo biomolecules in electrophoresis gels : analytical and micropreparative applications". *Anal Biochem* 328: 1-13
- Hardy, S., Brand, M., Mittler, G., et al. (2002), "TATA-binding protein-free TAF-containing complex (TFTC) and p300 are both required for efficient transcriptional activation". *J Biol Chem* 277 (36): 32875-82
- Hassan, A. H., Prochasson, P., Neely, K. E., et al. (2002), "Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes". *Cell* 111 (3): 369-79
- Helmlinger, D., Hardy, S., Sasorith, S., et al. (2004), "Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes". *Hum Mol Genet* 13 (12): 1257-65
- Henzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., et al. (1997), "Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation". *Chromosoma* 106 (6): 348-60

- Henry, K. W., Wyce, A., Lo, W. S., et al. (2003), "Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8". *Genes Dev* 17 (21): 2648-63
- Herceg, Z., Hulla, W., Gell, D., et al. (2001), "Disruption of Trrap causes early embryonic lethality and defects in cell cycle progression". *Nat Genet* 29 (2): 206-11
- Herceg, Z., Li, H., Cuenin, C., et al. (2003), "Genome-wide analysis of gene expression regulated by the HAT cofactor Trrap in conditional knockout cells". *Nucleic Acids Res* 31 (23): 7011-23
- Hernandez, N. (1993), "TBP, a universal eukaryotic transcription factor?" *Genes Dev* 7 (7B): 1291-308
- Hilfiker, A., Hilfiker-Kleiner, D., Pannuti, A., et al. (1997), "mof, a putative acetyl transferase gene related to the Tip60 and MOZ human genes and to the SAS genes of yeast, is required for dosage compensation in Drosophila". *Embo J* 16 (8): 2054-60
- Hiller, M., Chen, X., Pringle, M. J., et al. (2004), "Testis-specific TAF homologs collaborate to control a tissue-specific transcription program". *Development* 131 (21): 5297-308
- Hirschhorn, J. N., Brown, S. A., Clark, C. D., et al. (1992), "Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure". *Genes Dev* 6 (12A): 2288-98
- Ho, Y., Gruhler A, Heilbut A, et al. (2002), "Systematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry". *nature* 415 (6868): 180-183
- Hobom, U. et Dobbstein, M. (2004), "E1B-55-kilodalton protein is not required to block p53-induced transcription during adenovirus infection". *J Virol* 78 (14): 7685-97
- Hoffmann, A., Chiang, C. M., Oelgeschlager, T., et al. (1996), "A histone octamer-like structure within TFIID". *Nature* 380 (6572): 356-9
- Holmes, M. C. et Tjian, R. (2000), "Promoter-selective properties of the TBP-related factor TRF1". *Science* 288 (5467): 867-70
- Holstege, F. C., Fiedler, U. et Timmers, H. T. (1997), "Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation". *Embo J* 16 (24): 7468-80
- Hopfner, K. P., Karcher, A., Craig, L., et al. (2001), "Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase". *Cell* 105 (4): 473-85
- Hopfner, K. P., Putnam, C. D. et Tainer, J. A. (2002), "DNA double-strand break repair from head to tail". *Curr Opin Struct Biol* 12 (1): 115-22
- Horikawa, I., Tanaka, H., Yuasa, Y., et al. (1995), "Forced expression of YL-1 protein suppresses the anchorage-independent growth of Kirsten sarcoma virus-transformed NIH3T3 cells". *Exp Cell Res* 220 (1): 11-7
- Howe, L., Kusch, T., Muster, N., et al. (2002), "Yng1p modulates the activity of Sas3p as a component of the yeast NuA3 Hhistone acetyltransferase complex". *Mol Cell Biol* 22 (14): 5047-53
- Hozak, P. et Cook, P. R. (1994), "Replication factories". *Trends Cell Biol* 4 (2): 48-52
- Huang, J. et Dynan, W. S. (2002), "Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an MRE11/Rad50/Nbs1-containing fraction". *Nucleic Acids Res.* 30 (3): 667-674
- Huber, A., Bai, P., de Murcia, J. M., et al. (2004), "PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development". *DNA Repair (Amst)* 3 (8-9): 1103-8
- Huisinga, K. L. et Pugh, B. F. (2004), "A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in Saccharomyces cerevisiae". *Mol Cell* 13 (4): 573-85

- Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R. A., Jr., et al. (2004), "Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks". *Nature* 432 (7015): 406-11
- Iben, S., Tschochner, H., Bier, M., et al. (2002), "TFIIH plays an essential role in RNA polymerase I transcription". *Cell* 109 (3): 297-306
- Iizuka, M. et Stillman, B. (1999), "Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein". *J Biol Chem* 274 (33): 23027-34
- Ikura, T., Ogryzko, V. V., Grigoriev, M., et al. (2000), "Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis". *Cell* 102 (4): 463-73
- Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., et al. (2003), "DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation". *Oncogene* 22 (37): 5834-47
- Inamdar, K. V., Pouliot, J. J., Zhou, T., et al. (2002), "Conversion of phosphoglycolate to phosphate termini on 3' overhangs of DNA double strand breaks by the human tyrosyl-DNA phosphodiesterase hTdp1". *J Biol Chem* 277 (30): 27162-8
- Ingvarsdottir, K., Krogan, N. J., Emre, N. C., et al. (2005), "H2B ubiquitin protease Ubp8 and Sgf11 constitute a discrete functional module within the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA complex". *Mol Cell Biol* 25 (3): 1162-72
- Ira, G., Pelliccioli, A., Balijja, A., et al. (2004), "DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1". *Nature* 431 (7011): 1011-7
- Ito, M., Yuan, C. X., Okano, H. J., et al. (2000), "Involvement of the TRAP220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action". *Mol Cell* 5 (4): 683-93
- Jacobs, S. A. et Khorasanizadeh, S. (2002), "Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail". *Science* 295 (5562): 2080-3
- Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., et al. (1994), "Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor". *Cell* 79 (1): 107-17
- Jazayeri, A., McAINSH, A. D. et Jackson, S. P. (2004), "*Saccharomyces cerevisiae* Sin3p facilitates DNA double-strand break repair". *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (6): 1644-9
- Jeggo, P. A. et Lobrich, M. (2005), "Artemis Links ATM to Double Strand Break Rejoining". *Cell Cycle* 4 (3):
- Jiang, Y. W. et Stillman, D. J. (1996), "Epigenetic effects on yeast transcription caused by mutations in an actin-related protein present in the nucleus". *Genes Dev* 10 (5): 604-19
- Jin, S., Inoue, S. et Weaver, D. T. (1997), "Functions of the DNA dependent protein kinase". *Cancer Surv* 29: 221-61
- John, S., Howe, L., Tafrov, S. T., et al. (2000), "The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a yTAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex". *Genes Dev* 14 (10): 1196-208
- Johnson, R. D. et Jasin, M. (2000), "Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells". *Embo J* 19 (13): 3398-407
- Jung, M. et Dritschilo, A. (2001), "NF-kappa B signaling pathway as a target for human tumor radiosensitization". *Semin Radiat Oncol* 11 (4): 346-51
- Kalkhoven, E. (2004), "CBP and p300: HATs for different occasions". *Biochem Pharmacol* 68 (6): 1145-55
- Kamine, J., Elangovan, B., Subramanian, T., et al. (1996), "Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator". *Virology* 216 (2): 357-66
- Kanemaki, M., Kurokawa, Y., Matsu-ura, T., et al. (1999), "TIP49b, a new RuvB-like DNA helicase, is included in a complex together with another RuvB-like DNA helicase, TIP49a". *J Biol Chem* 274 (32): 22437-44

- Kelly, T. J., Qin, S., Gottschling, D. E., et al. (2000), "Type B histone acetyltransferase Hat1p participates in telomeric silencing". *Mol Cell Biol* 20 (19): 7051-8
- Khoury, G. et Gruss, P. (1983), "Enhancer elements". *Cell* 33 (2): 313-4
- Kim, B. Y., Kim, K. A., Kwon, O., et al. (2005), "NF- κ B inhibition radiosensitizes Ki-Ras-transformed cells to ionizing radiation". *Carcinogenesis*:
- Kim, J. L., Nikolov, D. B. et Burley, S. K. (1993a), "Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element". *Nature* 365 (6446): 520-7
- Kim, L. J., Seto, A. G., Nguyen, T. N., et al. (2001), "Human Taf(II)130 is a coactivator for NFATp". *Mol Cell Biol* 21 (10): 3503-13
- Kim, S. T., Lim, D. S., Canman, C. E., et al. (1999), "Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members". *J Biol Chem* 274 (53): 37538-43
- Kim, Y., Geiger, J. H., Hahn, S., et al. (1993b), "Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex". *Nature* 365 (6446): 512-20
- Kim, Y. J., Bjorklund, S., Li, Y., et al. (1994), "A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II". *Cell* 77 (4): 599-608
- Kimura, M., Suzuki, H. et 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 (5): 1577-88
- Kirschner, D. B., vom Baur, E., Thibault, C., et al. (2002), "Distinct mutations in yeast TAF(II)25 differentially affect the composition of TFIID and SAGA complexes as well as global gene expression patterns". *Mol Cell Biol* 22 (9): 3178-93
- Kobayashi, J. (2004), "Molecular Mechanism of the Recruitment of NBS1/hMRE11/hRAD50 Complex to DNA Double-strand Breaks: NBS1 Binds to gamma-H2AX through FHA/BRCT Domain". *J Radiat Res (Tokyo)* 45 (4): 473-8
- Koshland, D. E. et Guacci, V. (2000), "Sister chromatid cohesion: the beginning of a long and beautiful relationship". *Curr Opin Cell Biol* 12 (3): 297-301
- Krogan, N. J., Keogh, M. C., Datta, N., et al. (2003), "A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1". *Mol Cell* 12 (6): 1565-76
- Krogan, N. J., Baetz, K., Keogh, M. C., et al. (2004a), "Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4". *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (37): 13513-8
- Krogan, N. J., Lam, M. H., Fillingham, J., et al. (2004b), "Proteasome involvement in the repair of DNA double-strand breaks". *Mol Cell* 16 (6): 1027-34
- Krugmann, S. et Welch, H. (1998), "PI 3-kinase". *Curr Biol* 8 (23): R828
- Kruhlak, M. J., Hendzel, M. J., Fischle, W., et al. (2001), "Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin". *J Biol Chem* 276 (41): 38307-19
- Kulesza, C. A., Van Buskirk, H. A., Cole, M. D., et al. (2002), "Adenovirus E1A requires the yeast SAGA histone acetyltransferase complex and associates with SAGA components Gcn5 and Tra1". *Oncogene* 21 (9): 1411-22
- Kuo, M. H., Brownell, J. E., Sobel, R. E., et al. (1996), "Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines". *Nature* 383 (6597): 269-72

- Kurihara, N., Reddy, S. V., Araki, N., et al. (2004), "Role of TAFII-17, a VDR binding protein, in the increased osteoclast formation in Paget's Disease". *J Bone Miner Res* 19 (7): 1154-64
- Kuroda, M. I. et Kelley, R. L. (1999), "Sex and repression". *Science* 284 (5421): 1787-8
- Kusch, T., Guelman, S., Abmayr, S. M., et al. (2003), "Two Drosophila Ada2 homologues function in different multiprotein complexes". *Mol Cell Biol* 23 (9): 3305-19
- Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W. H., et al. (2004), "Acetylation by Tip60 Is Required for Selective Histone Variant Exchange at DNA Lesions". *Science*:
- Kutach, A. K. et 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 (13): 4754-64
- Ladurner, A. G., Inouye, C., Jain, R., et al. (2003), "Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries". *Mol Cell* 11 (2): 365-76
- Lagrange, T., Kapanidis, A. N., Tang, H., et al. (1998), "New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB". *Genes Dev* 12 (1): 34-44
- Lang, S. E., McMahon, S. B., Cole, M. D., et al. (2001), "E2F transcriptional activation requires TRRAP and GCN5 cofactors". *J Biol Chem* 276 (35): 32627-34
- Lang, S. E. et Hearing, P. (2003), "The adenovirus E1A oncoprotein recruits the cellular TRRAP/GCN5 histone acetyltransferase complex". *Oncogene* 22 (18): 2836-41
- Larner, J. M., Lee, H. et Hamlin, J. L. (1997), "S phase damage sensing checkpoints in mammalian cells". *Cancer Surv* 29: 25-45
- Larschan, E. et Winston, F. (2001), "The *S. cerevisiae* SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4". *Genes Dev* 15 (15): 1946-56
- Lavigne, A. C., Mengus, G., Gangloff, Y. G., et al. (1999), "Human TAF(II)55 interacts with the vitamin D(3) and thyroid hormone receptors and with derivatives of the retinoid X receptor that have altered transactivation properties". *Mol Cell Biol* 19 (8): 5486-94
- Le Beau, M. M., Espinosa, R., 3rd, Neuman, W. L., et al. (1993), "Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases". *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (12): 5484-8
- Le Masson, I., Yu, D. Y., Jensen, K., et al. (2003), "Yaf9, a novel NuA4 histone acetyltransferase subunit, is required for the cellular response to spindle stress in yeast". *Mol Cell Biol* 23 (17): 6086-102
- Lee, J. H., Ghirlando, R., Bhaskara, V., et al. (2003), "Regulation of Mre11/Rad50 by Nbs1: effects on nucleotide-dependent DNA binding and association with ataxia-telangiectasia-like disorder mutant complexes". *J Biol Chem* 278 (46): 45171-81
- Lee, j. H. et Paull, T. T. (2004), "Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex". *science* 304:
- Lee, J. H. et Paull, T. T. (2005), "ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex". *Science*:
- Lee, K. J., Huang, J., Takeda, Y., et al. (2000), "DNA ligase IV and XRCC4 form a stable mixed tetramer that functions synergistically with other repair factors in a cell-free end-joining system". *J Biol Chem* 275 (44): 34787-96
- Lee, T. I. et Young, R. A. (2000), "Transcription of eukaryotic protein-coding genes". *Annu Rev Genet* 34: 77-137
- Legube, G., Linares, L. K., Lemercier, C., et al. (2002), "Tip60 is targeted to proteasome-mediated degradation by Mdm2 and accumulates after UV irradiation". *Embo J* 21 (7): 1704-12

- Legube, G. et Trouche, D. (2003), "Identification of a larger form of the histone acetyl transferase Tip60". *Gene* 310: 161-8
- Legube, G., Linares, L. K., Tyteca, S., et al. (2004), "Role of the histone acetyl transferase Tip60 in the p53 pathway". *J Biol Chem* 279 (43): 44825-33
- Lemercier, C., Legube, G., Caron, C., et al. (2003), "Tip60 acetyltransferase activity is controlled by phosphorylation". *J Biol Chem* 278 (7): 4713-8
- Leppard, J. B., Dong, Z., Mackey, Z. B., et al. (2003), "Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair". *Mol Cell Biol* 23 (16): 5919-27
- Leurent, C., Sanders, S., Ruhlmann, C., et al. (2002), "Mapping histone fold TAFs within yeast TFIID". *Embo J* 21 (13): 3424-33
- Leurent, C., Sanders, S. L., Demeny, M. A., et al. (2004), "Mapping key functional sites within yeast TFIID". *Embo J* 23 (4): 719-27
- Leuther, K. K., Bushnell, D. A. et Kornberg, R. D. (1996), "Two-dimensional crystallography of TFIIB- and IIE-RNA polymerase II complexes: implications for start site selection and initiation complex formation". *Cell* 85 (5): 773-9
- Leveillard, T. et Wasylyk, B. (1997), "The MDM2 C-terminal region binds to TAFII250 and is required for MDM2 regulation of the cyclin A promoter". *J Biol Chem* 272 (49): 30651-61
- Lewis, B. A. et Reinberg, D. (2003), "The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation". *J Cell Sci* 116 (Pt 18): 3667-75
- Li, H., Cuenin, C., Murr, R., et al. (2004), "HAT cofactor Trrap regulates the mitotic checkpoint by modulation of Mad1 and Mad2 expression". *Embo J*:
- Li, Y., Flanagan, P. M., Tschochner, H., et al. (1994), "RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection". *Science* 263 (5148): 805-7
- Li, Y., Butenko, Y. et Grafí, G. (2005), "Histone deacetylation is required for progression through mitosis in tobacco cells". *Plant J* 41 (3): 346-52
- Lilley, K. S., Razzaq, A. et Dupree, P. (2002), "Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation". *Curr Opin Chem Biol* 6 (1): 46-50
- Lim, D. S., Kim, S. T., Xu, B., et al. (2000), "ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway". *Nature* 404 (6778): 613-7
- Lin, P. S., Marshall, N. F. et Dahmus, M. E. (2002), "CTD phosphatase: role in RNA polymerase II cycling and the regulation of transcript elongation". *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72: 333-65
- Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D. M., et al. (1999), "Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry". *Nat Biotechnol* 17 (7): 676-82
- Lisby, M., Mortensen, U. H. et Rothstein, R. (2003), "Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre". *Nat Cell Biol* 5 (6): 572-7
- Lisby, M. et Rothstein, R. (2004), "DNA damage checkpoint and repair centers". *Curr Opin Cell Biol* 16 (3): 328-34
- Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., et al. (1999), "p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage". *Mol Cell Biol* 19 (2): 1202-9
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X. S., et al. (2000), "Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint". *Genes Dev* 14 (12): 1448-59
- Liu, X., Tesfai, J., Evrard, Y. A., et al. (2003), "c-Myc transformation domain recruits the human STAGA complex and requires TRRAP and GCN5 acetylase activity for transcription activation". *J Biol Chem* 278 (22): 20405-12

- Lively, T. N., Ferguson, H. A., Galasinski, S. K., et al. (2001), "c-Jun binds the N terminus of human TAF(II)250 to derepress RNA polymerase II transcription in vitro". *J Biol Chem* 276 (27): 25582-8
- Lo, K. et Smale, S. T. (1996), "Generality of a functional initiator consensus sequence". *Gene* 182 (1-2): 13-22
- Lobachev, K., Vitriol, E., Stemple, J., et al. (2004), "Chromosome fragmentation after induction of a double-strand break is an active process prevented by the RMX repair complex". *Curr Biol* 14 (23): 2107-12
- Loewith, R., Meijer, M., Lees-Miller, S. P., et al. (2000), "Three yeast proteins related to the human candidate tumor suppressor p33(ING1) are associated with histone acetyltransferase activities". *Mol Cell Biol* 20 (11): 3807-16
- Logan, I. R., Sapountzi, V., Gaughan, L., et al. (2004), "Control of human PIRH2 protein stability: involvement of TIP60 and the proteasome". *J Biol Chem* 279 (12): 11696-704
- Lough, J. W. (2002), "Transient expression of TIP60 protein during early chick heart development". *Dev Dyn* 223 (3): 419-25
- Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., et al. (1992), "Human general transcription factor IIIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II". *Nature* 358 (6388): 641-5
- Lu, Y., Luo, Z. et Bregman, D. B. (2002), "RNA polymerase II large subunit is cleaved by caspases during DNA damage-induced apoptosis". *Biochem Biophys Res Commun* 296 (4): 954-61
- Lucke-Huhle, C. (1982), "Alpha-irradiation-induced G2 delay: a period of cell recovery". *Radiat Res* 89 (2): 298-308
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., et al. (1997), "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution". *Nature* 389 (6648): 251-60
- Luo, G., Yao, M. S., Bender, C. F., et al. (1999), "Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation". *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (13): 7376-81
- Luscher, B. (2001), "Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network". *Gene* 277 (1-2): 1-14
- Lv, J., Liu, H., Wang, Q., et al. (2003), "Molecular cloning of a novel human gene encoding histone acetyltransferase-like protein involved in transcriptional activation of hTERT". *Biochem Biophys Res Commun* 311 (2): 506-13
- Mahajan, K. N., Nick McElhinny, S. A., Mitchell, B. S., et al. (2002), "Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair". *Mol Cell Biol* 22 (14): 5194-202
- Maison, C., Bailly, D., Peters, A. H., et al. (2002), "Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component". *Nat Genet* 30 (3): 329-34
- Malone, R. E., Ward, T., Lin, S., et al. (1990), "The RAD50 gene, a member of the double strand break repair epistasis group, is not required for spontaneous mitotic recombination in yeast". *Curr Genet* 18 (2): 111-6
- Mark, M., Ghyselinck, N. B., Wendling, O., et al. (1999), "A genetic dissection of the retinoid signalling pathway in the mouse". *Proc Nutr Soc* 58 (3): 609-13
- Martianov, I., Brancorsini, S., Gansmuller, A., et al. (2002a), "Distinct functions of TBP and TLF/TRF2 during spermatogenesis: requirement of TLF for heterochromatic chromocenter formation in haploid round spermatids". *Development* 129 (4): 945-55
- Martianov, I., Viville, S. et Davidson, I. (2002b), "RNA polymerase II transcription in murine cells lacking the TATA binding protein". *Science* 298 (5595): 1036-9
- Martinez, E., Kundu, T. K., Fu, J., et al. (1998), "A human SPT3-TAFII31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID". *J Biol Chem* 273 (37): 23781-5

- Martinez, E., Palhan, V. B., Tjernberg, A., et al. (2001), "Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo". *Mol Cell Biol* 21 (20): 6782-95
- Martinez, E. (2002), "Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription". *Plant Mol Biol* 50 (6): 925-47
- Maser, R. S., Zinkel, R. et Petrini, J. H. (2001), "An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele". *Nat Genet.* 27 (4): 417-421
- Matangkasombut, O., Buratowski, R. M., Swilling, N. W., et al. (2000), "Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID". *Genes Dev* 14 (8): 951-62
- Mateescu, B., England, P., Halgand, F., et al. (2004), "Tethering of HP1 proteins to chromatin is relieved by phosphoacetylation of histone H3". *EMBO Rep* 5 (5): 490-6
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., et al. (2000), "Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro". *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (19): 10389-94
- Maya, R., Balass, M., Kim, S. T., et al. (2001), "ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage". *Genes Dev* 15 (9): 1067-77
- McAllister, D., Merlo, X. et Lough, J. (2002), "Characterization and expression of the mouse tat interactive protein 60 kD (TIP60) gene". *Gene* 289 (1-2): 169-76
- McMahon, S. B., Van Buskirk, H. A., Dugan, K. A., et al. (1998), "The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins". *Cell* 94 (3): 363-74
- Megee, P. C., Morgan, B. A. et Smith, M. M. (1995), "Histone H4 and the maintenance of genome integrity". *Genes Dev* 9 (14): 1716-27
- Meininghaus, M., Chapman, R. D., Horndasch, M., et al. (2000), "Conditional expression of RNA polymerase II in mammalian cells. Deletion of the carboxyl-terminal domain of the large subunit affects early steps in transcription". *J Biol Chem* 275 (32): 24375-82
- Meister, P., Poidevin, M., Francesconi, S., et al. (2003), "Nuclear factories for signalling and repairing DNA double strand breaks in living fission yeast". *Nucleic Acids Res* 31 (17): 5064-73
- Melo, J. et Toczyski, D. (2002), "A unified view of the DNA-damage checkpoint". *Curr Opin Cell Biol* 14 (2): 237-45
- Memedula, S. et Belmont, A. S. (2003), "Sequential recruitment of HAT and SWI/SNF components to condensed chromatin by VP16". *Curr Biol* 13 (3): 241-6
- Mengus, G., May, M., Carre, L., et al. (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 (11): 1381-95
- Mengus, G., Gangloff, Y. G., Carre, L., et al. (2000), "The human transcription factor IID subunit human TATA-binding protein-associated factor 28 interacts in a ligand-reversible manner with the vitamin D(3) and thyroid hormone receptors". *J Biol Chem* 275 (14): 10064-71
- Metzger, D., Scheer, E., Soldatov, A., et al. (1999), "Mammalian TAF(II)30 is required for cell cycle progression and specific cellular differentiation programmes". *Embo J* 18 (17): 4823-34
- Mirzoeva, O. K. et Petrini, J. H. (2001), "DNA damage-dependent nuclear dynamics of the MRE11 complex". *mol cell biol* 21 (1): 281-288
- Mitsiou, D. J. et Stunnenberg, H. G. (2000), "TAC, a TBP-sans-TAFs complex containing the unprocessed TFIIAalpha precursor and the TFIIAgamma subunit". *Mol Cell* 6 (3): 527-37

- Mitsiou, D. J. et Stunnenberg, H. G. (2003), "p300 is involved in formation of the TBP-TFIIA-containing basal transcription complex, TAC". *Embo J* 22 (17): 4501-11
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., et al. (2004), "ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex". *Science* 303 (5656): 343-8
- Monden, T., Kishi, M., Hosoya, T., et al. (1999), "p120 acts as a specific coactivator for 9-cis-retinoic acid receptor (RXR) on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/RXR heterodimers". *Mol Endocrinol* 13 (10): 1695-703
- Morales, V., Straub, T., Neumann, M. F., et al. (2004), "Functional integration of the histone acetyltransferase MOF into the dosage compensation complex". *Embo J* 23 (11): 2258-68
- Morrison, A. J., Highland, J., Krogan, N. J., et al. (2004), "INO80 and gamma-H2AX Interaction Links ATP-Dependent Chromatin Remodeling to DNA Damage Repair". *Cell* 119 (6): 767-75
- Muchardt, C., Guilleme, M., Seeler, J. S., et al. (2002), "Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha". *EMBO Rep* 3 (10): 975-81
- Muller, F. et Tora, L. (2004), "The multicoloured world of promoter recognition complexes". *Embo J* 23 (1): 2-8
- Murakami, K. S. et Darst, S. A. (2003), "Bacterial RNA polymerases: the whole story". *Curr Opin Struct Biol* 13 (1): 31-9
- Muratoglu, S., Georgieva, S., Papai, G., et al. (2003), "Two different Drosophila ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes". *Mol Cell Biol* 23 (1): 306-21
- Musacchio, A. et Hardwick, K. G. (2002), "The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling". *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (10): 731-41
- Myers, L. C. et Kornberg, R. D. (2000), "Mediator of transcriptional regulation". *Annu Rev Biochem* 69: 729-49
- Mymryk, J. S. et Smith, M. M. (1997), "Influence of the adenovirus 5 E1A oncogene on chromatin remodelling". *Biochem Cell Biol* 75 (2): 95-102
- Nakanishi, K., Taniguchi, T., Ranganathan, V., et al. (2002), "Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response". *Nat Cell Biol* 4 (12): 913-20
- Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., et al. (2001), "Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly". *Science* 292 (5514): 110-3
- Neal, K. C., Pannuti, A., Smith, E. R., et al. (2000), "A new human member of the MYST family of histone acetyltransferases with high sequence similarity to Drosophila MOF". *Biochim Biophys Acta* 1490 (1-2): 170-4
- Neuwald, A. F. et Poleksic, A. (2000), "PSI-BLAST searches using hidden markov models of structural repeats: prediction of an unusual sliding DNA clamp and of beta-propellers in UV-damaged DNA-binding protein". *Nucleic Acids Res* 28 (18): 3570-80
- Ng, H. H., Feng, Q., Wang, H., et al. (2002), "Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association". *Genes Dev* 16 (12): 1518-27
- Nikiforov, M. A., Chandriani, S., Park, J., et al. (2002), "TRRAP-dependent and TRRAP-independent transcriptional activation by Myc family oncoproteins". *Mol Cell Biol* 22 (14): 5054-63
- Norbury, C. J. et Zhivotovsky, B. (2004), "DNA damage-induced apoptosis". *Oncogene* 23 (16): 2797-808
- Nourani, A., Doyon, Y., Utley, R. T., et al. (2001), "Role of an ING1 growth regulator in transcriptional activation and targeted histone acetylation by the NuA4 complex". *Mol Cell Biol* 21 (22): 7629-40

- O'Brien, T. et Tjian, R. (2000), "Different functional domains of TAFII250 modulate expression of distinct subsets of mammalian genes". *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (6): 2456-61
- Oberholzer, U. et Collart, M. A. (1999), "In vitro transcription of a TATA-less promoter: negative regulation by the Not1 protein". *Biol Chem* 380 (12): 1365-70
- Oelgeschlager, T., Chiang, C. M. et Roeder, R. G. (1996), "Topology and reorganization of a human TFIID-promoter complex". *Nature* 382 (6593): 735-8
- Oelgeschlager, T., Tao, Y., Kang, Y. K., et al. (1998), "Transcription activation via enhanced preinitiation complex assembly in a human cell-free system lacking TAFIIs". *Mol Cell* 1 (6): 925-31
- Ogryzko, V. V., Kotani, T., Zhang, X., et al. (1998), "Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex". *Cell* 94 (1): 35-44
- Okano, S., Lan, L., Caldecott, K. W., et al. (2003), "Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells". *Mol Cell Biol* 23 (11): 3974-81
- Oki, M., Valenzuela, L., Chiba, T., et al. (2004), "Barrier proteins remodel and modify chromatin to restrict silenced domains". *Mol Cell Biol* 24 (5): 1956-67
- Orphanides, G., Lagrange, T. et Reinberg, D. (1996), "The general transcription factors of RNA polymerase II". *Genes Dev* 10 (21): 2657-83
- Osada, S., Sutton, A., Muster, N., et al. (2001), "The yeast SAS (something about silencing) protein complex contains a MYST-type putative acetyltransferase and functions with chromatin assembly factor ASF1". *Genes Dev* 15 (23): 3155-68
- Ossipow, V., Tassan, J. P., Nigg, E. A., et al. (1995), "A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation". *Cell* 83 (1): 137-46
- Otomo, T., Hishii, M., Arai, H., et al. (2004), "Microarray analysis of temporal gene responses to ionizing radiation in two glioblastoma cell lines: up-regulation of DNA repair genes". *J Radiat Res (Tokyo)* 45 (1): 53-60
- Pal, S., Yun, R., Datta, A., et al. (2003), "mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad". *Mol Cell Biol* 23 (21): 7475-87
- Palancade, B. et Bensaude, O. (2003), "Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation". *Eur J Biochem* 270 (19): 3859-70
- Park, D. J., Pask, A. J., Huynh, K., et al. (2004), "Comparative analysis of ATRX, a chromatin remodeling protein". *Gene* 339: 39-48
- Park, J., Wood, M. A. et Cole, M. D. (2002), "BAF53 forms distinct nuclear complexes and functions as a critical c-Myc-interacting nuclear cofactor for oncogenic transformation". *Mol Cell Biol* 22 (5): 1307-16
- Parthun, M. R., Widom, J. et Gottschling, D. E. (1996), "The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism". *Cell* 87 (1): 85-94
- Pascreau, G., Arlot-Bonnemains, Y. et Prigent, C. (2003), "Phosphorylation of histone and histone-like proteins by aurora kinases during mitosis". *Prog Cell Cycle Res* 5: 369-74
- Patel, J. H., Du, Y., Ard, P. G., et al. (2004), "The c-MYC Oncoprotein Is a Substrate of the Acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60". *Mol Cell Biol* 24 (24): 10826-34
- Patikoglou, G. A., Kim, J. L., Sun, L., et al. (1999), "TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution". *Genes Dev* 13 (24): 3217-30
- Paull, T. T. et Gellert, M. (1998), "The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks". *Mol Cell* 1 (7): 969-79

- Paull, T. T. et Gellert, M. (1999), "Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex". *Genes Dev* 13 (10): 1276-88
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., et al. (2000), "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage". *Curr Biol* 10 (15): 886-95
- Paulson, M., Press, C., Smith, E., et al. (2002), "IFN-Stimulated transcription through a TBP-free acetyltransferase complex escapes viral shutoff". *Nat Cell Biol* 4 (2): 140-7
- Peterson, C. L. et Cote, J. (2004), "Cellular machineries for chromosomal DNA repair". *Genes Dev* 18 (6): 602-16
- Peterson, C. L. et Laniel, M. A. (2004), "Histones and histone modifications". *Curr Biol* 14 (14): R546-51
- Petrakis, T. G., Wittschieben, B. O. et Svejstrup, J. Q. (2004), "Molecular architecture, structure-function relationship, and importance of the Elp3 subunit for the RNA binding of holo-elongator". *J Biol Chem* 279 (31): 32087-92
- Petrini, J. H. et Stracker, T. H. (2003), "The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators". *Trends Cell Biol* 13 (9): 458-62
- Petty, K. J., Krimkevich, Y. I. et Thomas, D. (1996), "A TATA binding protein-associated factor functions as a coactivator for thyroid hormone receptors". *Mol Endocrinol* 10 (12): 1632-45
- Pham, A. D. et Sauer, F. (2000), "Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in Drosophila". *Science* 289 (5488): 2357-60
- Poch, O. et Winsor, B. (1997), "Who's who among the Saccharomyces cerevisiae actin-related proteins? A classification and nomenclature proposal for a large family". *Yeast* 13 (11): 1053-8
- Pointud, J. C., Mengus, G., Brancorsini, S., et al. (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 (Pt 9): 1847-58
- Poirier, G. G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., et al. (1982), "Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure". *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (11): 3423-7
- Polioudaki, H., Markaki, Y., Kourmouli, N., et al. (2004), "Mitotic phosphorylation of histone H3 at threonine 3". *FEBS Lett* 560 (1-3): 39-44
- Poon, D., Bai, Y., Campbell, A. M., et al. (1995), "Identification and characterization of a TFIID-like multiprotein complex from Saccharomyces cerevisiae". *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (18): 8224-8
- Poveda, A., Pamblanco, M., Tafrov, S., et al. (2004), "Hif1 is a component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus". *J Biol Chem* 279 (16): 16033-43
- Powell, D. W., Weaver, C. M., Jennings, J. L., et al. (2004), "Cluster analysis of mass spectrometry data reveals a novel component of SAGA". *Mol Cell Biol* 24 (16): 7249-59
- Pray-Grant, M. G., Schieltz, D., McMahan, S. J., et al. (2002), "The novel SLIK histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway". *Mol Cell Biol* 22 (24): 8774-86
- Pray-Grant, M. G., Daniel, J. A., Schieltz, D., et al. (2005), "Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation". *Nature*:
- Preuss, U., Landsberg, G. et Scheidtmann, K. H. (2003), "Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase". *Nucleic Acids Res* 31 (3): 878-85
- Pugh, B. F. (2000), "Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein". *Gene* 255 (1): 1-14
- Qi, D., Larsson, J. et Mannervik, M. (2004), "Drosophila Ada2b is required for viability and normal histone H3 acetylation". *Mol Cell Biol* 24 (18): 8080-9

- Qin, S. et Parthun, M. R. (2002), "Histone H3 and the histone acetyltransferase Hat1p contribute to DNA double-strand break repair". *Mol Cell Biol* 22 (23): 8353-65
- Rachez, C., Lemon, B. D., Suldan, Z., et al. (1999), "Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex". *Nature* 398 (6730): 824-8
- Ran, Q. et Pereira-Smith, O. M. (2000), "Identification of an alternatively spliced form of the Tat interactive protein (Tip60), Tip60(beta)". *Gene* 258 (1-2): 141-6
- Rani, P. G., Ranish, J. A. et Hahn, S. (2004), "RNA polymerase II (Pol II)-TFIIF and Pol II-mediator complexes: the major stable Pol II complexes and their activity in transcription initiation and reinitiation". *Mol Cell Biol* 24 (4): 1709-20
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., et al. (2000), "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases". *Nature* 406 (6796): 593-9
- Reese, J. C. (2003), "Basal transcription factors". *Curr Opin Genet Dev* 13 (2): 114-8
- Reid, J. L., Iyer, V. R., Brown, P. O., et al. (2000), "Coordinate regulation of yeast ribosomal protein genes is associated with targeted recruitment of Esa1 histone acetylase". *Mol Cell* 6 (6): 1297-307
- Riballo, E., Kuhne, M., Rief, N., et al. (2004), "A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis, and Proteins Locating to gamma-H2AX Foci". *Mol Cell* 16 (5): 715-24
- Rice, J. C., Nishioka, K., Sarma, K., et al. (2002), "Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes". *Genes Dev* 16 (17): 2225-30
- Richardson, C., Horikoshi, N. et Pandita, T. K. (2004), "The role of the DNA double-strand break response network in meiosis". *DNA Repair (Amst)* 3 (8-9): 1149-64
- Rivera-Calzada, A., Maman, J. P., Spagnolo, L., et al. (2005), "Three-dimensional structure and regulation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs)". *Structure (Camb)* 13 (2): 243-55
- Rodriguez-Navarro, S., Fischer, T., Luo, M. J., et al. (2004), "Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery". *Cell* 116 (1): 75-86
- Roeder, R. G. (1996), "The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II". *Trends Biochem Sci* 21 (9): 327-35
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., et al. (1998), "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139". *J Biol Chem* 273 (10): 5858-68
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., et al. (1999), "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo". *J Cell Biol* 146 (5): 905-16
- Roth, S. Y., Denu, J. M. et Allis, C. D. (2001), "Histone acetyltransferases". *Annu Rev Biochem* 70: 81-120
- Rountree, M. R., Bachman, K. E. et Baylin, S. B. (2000), "DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci". *Nat Genet* 25 (3): 269-77
- Rouse, J. et Jackson, S. P. (2002), "Lcd1p recruits Mec1p to DNA lesions in vitro and in vivo". *Mol Cell* 9 (4): 857-69
- Roy, A. L., Malik, S., Meisterernst, M., et al. (1993), "An alternative pathway for transcription initiation involving TFII-I". *Nature* 365 (6444): 355-9
- Sakamoto-Hojo, E. T., Mello, S. S., Pereira, E., et al. (2003), "Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress". *Mutat Res* 544 (2-3): 403-13

- Saleh, A., Schieltz, D., Ting, N., et al. (1998), "Tra1p is a component of the yeast Ada.Spt transcriptional regulatory complexes". *J Biol Chem* 273 (41): 26559-65
- Sanders, S. L., Jennings, J., Canutescu, A., et al. (2002), "Proteomics of the eukaryotic transcription machinery: identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry". *mol cell biol.* 22 (13): 4723-4738
- Sarraf, S. A. et Stancheva, I. (2004), "Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly". *Mol Cell* 15 (4): 595-605
- Sauer, F. et Tjian, R. (1997), "Mechanisms of transcriptional activation: differences and similarities between yeast, Drosophila, and man". *Curr Opin Genet Dev* 7 (2): 176-81
- Schiltz, R. L., Mizzen, C. A., Vassilev, A., et al. (1999), "Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates". *J Biol Chem* 274 (3): 1189-92
- Schubeler, D., Francastel, C., Cimborra, D. M., et al. (2000), "Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus". *Genes Dev* 14 (8): 940-50
- Schultz, P., Fribourg, S., Poterszman, A., et al. (2000), "Molecular structure of human TFIID". *Cell* 102 (5): 599-607
- Schwartz, D. C. et Hochstrasser, M. (2003), "A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers". *Trends Biochem Sci* 28 (6): 321-8
- Selleck, W., Howley, R., Fang, Q., et al. (2001), "A histone fold TAF octamer within the yeast TFIID transcriptional coactivator". *Nat Struct Biol* 8 (8): 695-700
- Shall, S. et de Murcia, G. (2000), "Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?" *Mutat Res* 460 (1): 1-15
- Shaw, M. M. et Riederer, B. M. (2003), "Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis". *Proteomics* 3 (8): 1408-17
- Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A., et al. (2000), "A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing". *Nature* 406 (6795): 541-4
- Sheridan, A. M., Force, T., Yoon, H. J., et al. (2001), "PLIP, a novel splice variant of Tip60, interacts with group IV cytosolic phospholipase A(2), induces apoptosis, and potentiates prostaglandin production". *Mol Cell Biol* 21 (14): 4470-81
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., et al. (2004), "Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1". *Cell* 119 (7): 941-53
- Shiloh, Y. (2003), "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity". *Nat Rev Cancer* 3 (3): 155-68
- Shimono, Y., Murakami, H., Hasegawa, Y., et al. (2000), "RET finger protein is a transcriptional repressor and interacts with enhancer of polycomb that has dual transcriptional functions". *J Biol Chem* 275 (50): 39411-9
- Shiomi, Y., Shinozaki, A., Nakada, D., et al. (2002), "Clamp and clamp loader structures of the human checkpoint protein complexes, Rad9-1-1 and Rad17-RFC". *Genes Cells* 7 (8): 861-8
- Shuen, M., Avvakumov, N., Walfish, P. G., et al. (2002), "The adenovirus E1A protein targets the SAGA but not the ADA transcriptional regulatory complex through multiple independent domains". *J Biol Chem* 277 (34): 30844-51
- Shuen, M., Avvakumov, N., Torchia, J., et al. (2003), "The E1A proteins of all six human adenovirus subgroups target the p300/CBP acetyltransferases and the SAGA transcriptional regulatory complex". *Virology* 316 (1): 75-83
- Sif, S. (2004), "ATP-dependent nucleosome remodeling complexes: enzymes tailored to deal with chromatin". *J Cell Biochem* 91 (6): 1087-98

- Silverman, N., Agapite, J. et Guarente, L. (1994), "Yeast ADA2 protein binds to the VP16 protein activation domain and activates transcription". *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (24): 11665-8
- Sims, R. J., 3rd, Nishioka, K. et Reinberg, D. (2003), "Histone lysine methylation: a signature for chromatin function". *Trends Genet* 19 (11): 629-39
- Singh, U., Rogers, J. B., Mann, B. J., et al. (1997), "Transcription initiation is controlled by three core promoter elements in the hgl5 gene of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*". *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (16): 8812-7
- Sliva, D., Zhu, Y. X., Tsai, S., et al. (1999), "Tip60 interacts with human interleukin-9 receptor alpha-chain". *Biochem Biophys Res Commun* 263 (1): 149-55
- Smale, S. T. et Baltimore, D. (1989), "The "initiator" as a transcription control element". *Cell* 57 (1): 103-13
- Smale, S. T. et Kadonaga, J. T. (2003), "The RNA polymerase II core promoter". *Annu Rev Biochem* 72: 449-79
- Smith, C. L., Onate, S. A., Tsai, M. J., et al. (1996), "CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription". *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (17): 8884-8
- Smith, E. R., Pannuti, A., Gu, W., et al. (2000), "The drosophila MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation". *Mol Cell Biol* 20 (1): 312-8
- Smith, G. C., Cary, R. B., Lakin, N. D., et al. (1999), "Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM". *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (20): 11134-9
- Smith, G. C. et Jackson, S. P. (1999), "The DNA-dependent protein kinase". *Genes Dev* 13 (8): 916-34
- Sosunov, V., Sosunova, E., Mustaev, A., et al. (2003), "Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase". *Embo J* 22 (9): 2234-44
- Soutoglou, E., Demeny, M. A., Scheer, E., et al. (2005), "The nuclear import of TAF10 is regulated by one of its three histone fold domain containing interaction partners". *Mol Cell Biol*:
- Sterner, D. E., Grant, P. A., Roberts, S. M., et al. (1999), "Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction". *Mol Cell Biol* 19 (1): 86-98
- Sterner, D. E. et Berger, S. L. (2000), "Acetylation of histones and transcription-related factors". *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (2): 435-59
- Sterner, D. E., Belotserkovskaya, R. et Berger, S. L. (2002), "SALSA, a variant of yeast SAGA, contains truncated Spt7, which correlates with activated transcription". *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (18): 11622-7
- Stewart, G. S., Maser, R. S., Stankovic, T., et al. (1999), "The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder". *Cell* 99 (6): 577-87
- Stewart, M. D., Li, J. et Wong, J. (2005), "Relationship between Histone H3 Lysine 9 Methylation, Transcription Repression, and Heterochromatin Protein 1 Recruitment". *Mol Cell Biol* 25 (7): 2525-38
- Strahl, B. D. et Allis, C. D. (2000), "The language of covalent histone modifications". *Nature* 403 (6765): 41-5
- Suh, D., Wilson, D. M., 3rd et Povirk, L. F. (1997), "3'-phosphodiesterase activity of human apurinic/aprimidinic endonuclease at DNA double-strand break ends". *Nucleic Acids Res* 25 (12): 2495-500
- Sun, Z. W. et Allis, C. D. (2002), "Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast". *Nature* 418 (6893): 104-8
- Suzuki, Y., Tsunoda, T., Sese, J., et al. (2001), "Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes". *Genome Res* 11 (5): 677-84

- Svejstrup, J. Q. (2004), "The RNA polymerase II transcription cycle: cycling through chromatin". *Biochim Biophys Acta* 1677 (1-3): 64-73
- Tanner, K. G., Langer, M. R. et Denu, J. M. (2000a), "Kinetic mechanism of human histone acetyltransferase P/CAF". *Biochemistry* 39 (39): 11961-9
- Tanner, K. G., Langer, M. R., Kim, Y., et al. (2000b), "Kinetic mechanism of the histone acetyltransferase GCN5 from yeast". *J Biol Chem* 275 (29): 22048-55
- Tartier, L., Spenlehauer, C., Newman, H. C., et al. (2003), "Local DNA damage by proton microbeam irradiation induces poly(ADP-ribose) synthesis in mammalian cells". *Mutagenesis* 18 (5): 411-6
- Taubert, S., Gorrini, C., Frank, S. R., et al. (2004), "E2F-Dependent Histone Acetylation and Recruitment of the Tip60 Acetyltransferase Complex to Chromatin in Late G(1)". *Mol Cell Biol* 24 (10): 4546-56
- Tauchi, H., Kobayashi, J., Morishima, K., et al. (2001), "The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50[middle dot]hMRE11[middle dot]NBS1 complex DNA repair activity". *J Biol Chem* 276 (1): 12-5
- Tauchi, H., Kobayashi, J., Morishima, K., et al. (2002), "Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells". *Nature* 420 (6911): 93-8
- Telese, F., Bruni, P., Donizetti, A., et al. (2005), "Transcription regulation by the adaptor protein Fe65 and the nucleosome assembly factor SET". *EMBO Rep* 6 (1): 77-82
- Thompson, L. H. et Schild, D. (2001), "Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability". *Mutat Res* 477 (1-2): 131-53
- Tibbetts, R. S., Brumbaugh, K. M., Williams, J. M., et al. (1999), "A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53". *Genes Dev* 13 (2): 152-7
- Topalidou, I., Papamichos-Chronakis, M. et Thireos, G. (2003), "Post-TATA binding protein recruitment clearance of Gcn5-dependent histone acetylation within promoter nucleosomes". *Mol Cell Biol* 23 (21): 7809-17
- Tora, L. (2002), "A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription". *Genes Dev* 16 (6): 673-5
- Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., et al. (1997), "The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function". *Nature* 387 (6634): 677-84
- Toueille, M. et Hubscher, U. (2004), "Regulation of the DNA replication fork: a way to fight genomic instability". *Chromosoma* 113 (3): 113-25
- Tran, H. G., Steger, D. J., Iyer, V. R., et al. (2000), "The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor". *Embo J* 19 (10): 2323-31
- Trujillo, K. M., Yuan, S. S., Lee, E. Y., et al. (1998), "Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95". *J Biol Chem* 273 (34): 21447-50
- Tsai, F. T., Littlefield, O., Kosa, P. F., et al. (1998), "Polarity of transcription on Pol II and archaeal promoters: where is the "one-way sign" and how is it read?". *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63: 53-61
- Tsai, F. T. et Sigler, P. B. (2000), "Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters". *Embo J* 19 (1): 25-36
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A. P., et al. (1998), "Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III". *Mol Cell Biol* 18 (8): 4629-38
- Tsukamoto, Y., Kato, J. et Ikeda, H. (1997), "Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*". *Nature* 388 (6645): 900-3

- Turner, B. M. (2002), "Cellular memory and the histone code". *Cell* 111 (3): 285-91
- Udayakumar, D., Bladen, C. L., Hudson, F. Z., et al. (2003), "Distinct pathways of nonhomologous end joining that are differentially regulated by DNA-dependent protein kinase mediated phosphorylation". *J Biol Chem*:
- Unal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., et al. (2004), "DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain". *Mol Cell* 16 (6): 991-1002
- Unno, A., Takada, I., Takezawa, S., et al. (2005), "TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function". *Biochem Biophys Res Commun* 327 (3): 933-8
- Utley, R. T. et Cote, J. (2003), "The MYST family of histone acetyltransferases". *Curr Top Microbiol Immunol* 274: 203-36
- Valerie, K. et Povirk, L. F. (2003), "Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair". *Oncogene* 22 (37): 5792-812
- van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., et al. (2004), "Recruitment of the INO80 Complex by H2A Phosphorylation Links ATP-Dependent Chromatin Remodeling with DNA Double-Strand Break Repair". *Cell* 119 (6): 777-88
- Van Dyck, E., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., et al. (2001), "Visualization of recombination intermediates produced by RAD52-mediated single-strand annealing". *EMBO Rep* 2 (10): 905-9
- Vaquero, A., Loyola, A. et Reinberg, D. (2003), "The constantly changing face of chromatin". *Sci Aging Knowledge Environ* 2003 (14): RE4
- Vassilev, A., Yamauchi, J., Kotani, T., et al. (1998), "The 400 kDa subunit of the PCAF histone acetylase complex belongs to the ATM superfamily". *Mol Cell* 2 (6): 869-75
- Verrijzer, C. P. et Tjian, R. (1996), "TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity". *Trends Biochem Sci* 21 (9): 338-42
- Vervoorts, J., Luscher-Firzlauff, J. M., Rottmann, S., et al. (2003), "Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP". *EMBO Rep* 4 (5): 484-90
- Vetting, M. W., LP, S. d. C., Yu, M., et al. (2005), "Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases". *Arch Biochem Biophys* 433 (1): 212-26
- Vignali, M., Steger, D. J., Neely, K. E., et al. (2000), "Distribution of acetylated histones resulting from Gal4-VP16 recruitment of SAGA and NuA4 complexes". *Embo J* 19 (11): 2629-40
- Vo, N. et Goodman, R. H. (2001), "CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation". *J Biol Chem* 276 (17): 13505-8
- Vogelstein, B., Lane, D. et Levine, A. J. (2000), "Surfing the p53 network". *Nature* 408 (6810): 307-10
- vom Baur, E., Harbers, M., Um, S. J., et al. (1998), "The yeast Ada complex mediates the ligand-dependent activation function AF-2 of retinoid X and estrogen receptors". *Genes Dev* 12 (9): 1278-89
- Wahl, G. M. et Carr, A. M. (2001), "The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53". *Nat Cell Biol* 3 (12): E277-86
- Wallberg, A. E., Neely, K. E., Gustafsson, J. A., et al. (1999), "Histone acetyltransferase complexes can mediate transcriptional activation by the major glucocorticoid receptor activation domain". *Mol Cell Biol* 19 (9): 5952-9
- Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P. B., et al. (2002), "53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint". *Science* 298 (5597): 1435-8
- Wang, W., Carey, M. et Gralla, J. D. (1992), "Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening". *Science* 255 (5043): 450-3

- Wang, W., Cote, J., Xue, Y., et al. (1996a), "Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex". *Embo J* 15 (19): 5370-82
- Wang, W., Xue, Y., Zhou, S., et al. (1996b), "Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes". *Genes Dev* 10 (17): 2117-30
- Wang, X. et Haber, J. E. (2004), "Role of saccharomyces single-stranded DNA-binding protein RPA in the strand invasion step of double-strand break repair". *PLoS Biol* 2 (1): E21
- Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., et al. (2000), "BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures". *Genes Dev* 14 (8): 927-39
- Warfield, L., Ranish, J. A. et Hahn, S. (2004), "Positive and negative functions of the SAGA complex mediated through interaction of Spt8 with TBP and the N-terminal domain of TFIIA". *Genes Dev* 18 (9): 1022-34
- Wassarman, D. A. et Sauer, F. (2001), "TAF(II)250: a transcription toolbox". *J Cell Sci* 114 (Pt 16): 2895-902
- Weideman, C. A., Netter, R. C., Benjamin, L. R., et al. (1997), "Dynamic interplay of TFIIA, TBP and TATA DNA". *J Mol Biol* 271 (1): 61-75
- Weissman, J. D., Brown, J. A., Howcroft, T. K., et al. (1998), "HIV-1 tat binds TAFII250 and represses TAFII250-dependent transcription of major histocompatibility class I genes". *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (20): 11601-6
- Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, X., et al. (1998), "Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II". *Nature* 393 (6681): 187-91
- Willy, P. J., Kobayashi, R. et Kadonaga, J. T. (2000), "A basal transcription factor that activates or represses transcription". *Science* 290 (5493): 982-5
- Winkler, G. S., Kristjuhan, A., Erdjument-Bromage, H., et al. (2002), "Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo". *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (6): 3517-22
- Wittschieben, B. O., Otero, G., de Bizemont, T., et al. (1999), "A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme". *Mol Cell* 4 (1): 123-8
- Wood, M. A., McMahon, S. B. et Cole, M. D. (2000), "An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc". *Mol Cell* 5 (2): 321-30
- Wu, P. Y. et Winston, F. (2002), "Analysis of Spt7 function in the Saccharomyces cerevisiae SAGA coactivator complex". *Mol Cell Biol* 22 (15): 5367-79
- Wu, P. Y., Ruhlmann, C., Winston, F., et al. (2004), "Molecular architecture of the S. cerevisiae SAGA complex". *Mol Cell* 15 (2): 199-208
- Wu, S. Y., Thomas, M. C., Hou, S. Y., et al. (1999), "Isolation of mouse TFIID and functional characterization of TBP and TFIID in mediating estrogen receptor and chromatin transcription". *J Biol Chem* 274 (33): 23480-90
- Xiao, Y. et Weaver, D. T. (1997), "Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the DSB repair MRE11 protein in murine embryonic stem cells". *Nucleic Acids Res.* 25 (15): 2985-2991
- Xie, J., Collart, M., Lemaire, M., et al. (2000), "A single point mutation in TFIIA suppresses NC2 requirement in vivo". *Embo J* 19 (4): 672-82
- Xu, W., Edmondson, D. G., Evrard, Y. A., et al. (2000), "Loss of Gcn5l2 leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development". *Nat Genet* 26 (2): 229-32

- Yamamoto, K. et Sonoda, M. (2003), "Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1". *Biochem Biophys Res Commun* 301 (2): 287-92
- Yamamoto, T. et Horikoshi, M. (1997), "Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60". *J Biol Chem* 272 (49): 30595-8
- Yamauchi, T., Yamauchi, J., Kuwata, T., et al. (2000), "Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAF-B/GCN5 in mouse embryogenesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (21): 11303-6
- Yamit-Hezi, A. et Dikstein, R. (1998), "TAFII105 mediates activation of anti-apoptotic genes by NF-kappaB". *Embo J* 17 (17): 5161-9
- Yamit-Hezi, A., Nir, S., Wolstein, O., et al. (2000), "Interaction of TAFII105 with selected p65/RelA dimers is associated with activation of subset of NF-kappa B genes". *J Biol Chem* 275 (24): 18180-7
- Yan, Y., Barlev, N. A., Haley, R. H., et al. (2000), "Crystal structure of yeast Esa1 suggests a unified mechanism for catalysis and substrate binding by histone acetyltransferases". *Mol Cell* 6 (5): 1195-205
- Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., et al. (2002), "Nuclear receptor function requires a TFIIIC-type histone acetyl transferase complex". *Mol Cell* 9 (3): 553-62
- Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., et al. (1996), "A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A". *Nature* 382 (6589): 319-24
- Yazdi, P. T., Wang, Y., Zhao, S., et al. (2002), "SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint". *Genes Dev* 16 (5): 571-82
- Yochum, G. S. et Ayer, D. E. (2002), "Role for the mortality factors MORF4, MRGX, and MRG15 in transcriptional repression via associations with Pfl1, mSin3A, and Transducin-Like Enhancer of Split". *Mol Cell Biol* 22 (22): 7868-76
- Yuan, Z. M., Huang, Y., Ishiko, T., et al. (1999), "Function for p300 and not CBP in the apoptotic response to DNA damage". *Oncogene* 18 (41): 5714-7
- Yudkovsky, N., Ranish, J. A. et Hahn, S. (2000), "A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator". *Nature* 408 (6809): 225-9
- Zawel, L., Kumar, K. P. et Reinberg, D. (1995), "Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription". *Genes Dev* 9 (12): 1479-90
- Zegerman, P., Canas, B., Pappin, D., et al. (2002), "Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex". *J Biol Chem* 277 (14): 11621-4
- Zeng, L. et Zhou, M. M. (2002), "Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain". *FEBS Lett* 513 (1): 124-8
- Zenzie-Gregory, B., Khachi, A., Garraway, I. P., et al. (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 (7): 3841-9
- Zhang, W., Bone, J. R., Edmondson, D. G., et al. (1998), "Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase". *Embo J* 17 (11): 3155-67
- Zhang, Y. et Reinberg, D. (2001), "Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails". *Genes Dev* 15 (18): 2343-60
- Zhao, K., Wang, W., Rando, O. J., et al. (1998), "Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling". *Cell* 95 (5): 625-36
- Zhu, J., Petersen, S., Tessarolo, L., et al. (2001), "Targeted disruption of the NBS gene leads to early embryonic lethality in mice". *Curr Biol* 11 (2): 105-109

Zimmermann, K., Ahrens, K., Matthes, S., et al. (2002), "Targeted disruption of the GAS41 gene encoding a putative transcription factor indicates that GAS41 is essential for cell viability". *J Biol Chem* 277 (21): 18626-31

Zurita, M. et Merino, C. (2003), "The transcriptional complexity of the TFIID complex". *Trends Genet* 19 (10): 578-84