



Remodelage de la chromatine et transcription : Étude d'un mutant du complexe RSC chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Véronique Bordas-Le Floch

► To cite this version:

Véronique Bordas-Le Floch. Remodelage de la chromatine et transcription : Étude d'un mutant du complexe RSC chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Autre [q-bio.OT]. INAPG (AgroParisTech), 2002. Français. NNT : . tel-00005672

HAL Id: tel-00005672

<https://pastel.hal.science/tel-00005672>

Submitted on 5 Apr 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

École Doctorale ABIES

présentée et soutenue publiquement

par

Véronique BORDAS-LE FLOCH

le 31 octobre 2002

*Remodelage de la chromatine et transcription : Étude d'un mutant du
complexe RSC chez la levure Saccharomyces cerevisiae.*

JURY

Pr. Claude GAILLARDIN, Président

Dr. Fabrice CONFALONIERI, Examineur

Dr. Michel WERNER, Examineur

Dr. Geneviève PIETU, Rapporteur

Pr. Michel AIGLE, Rapporteur

Ce travail a été effectué au laboratoire de physiogénomique du Service de biochimie et Génétique Moléculaire. Je tiens à remercier André SENTENAC pour m'avoir accueillie dans son service et m'avoir permis d'y réaliser mon DEA puis cette thèse.

Ce travail a été effectué sous la direction de Michel WERNER. Michel, merci de m'avoir accueillie dans ton labo. Ça n'a pas été toujours facile, ces années ont parfois ressemblé à des montagnes russes avec des hauts et des bas. L'essentiel est que l'on soit arrivé au bout de chemin...

J'exprime ma reconnaissance à Mme Geneviève PIETU et M. Michel AIGLE qui ont accepté d'assumer la tâche de rapporteur de ce manuscrit ainsi qu'à M. Fabrice CONFALONIERI et M. Claude GAILLARDIN pour avoir examiner ce travail.

Au cours de ces années passées à Saclay, j'ai côtoyé nombre de personnes qui m'ont aidé à un moment ou un autre. À tous ceux que je ne cite pas ici mais que je n'oublie pas, je tiens également à vous adresser mes remerciements.

Pierre, je tiens dans ces quelques lignes à te remercier pour l'aide que tu m'as apportée tout au long de ces années. Tes conseils et remarques lors de la rédaction du manuscrit m'ont été extrêmement précieux.

Dans toutes les thèses du SBGM, il y a une constante qui fait l'unanimité au SBGM : Lucette, un petit bout de femme, qui par sa présence, sa bonne humeur et sa gentillesse a contribué à nous donner de merveilleux souvenirs. Les nouvelles recrues n'auront pas la joie de te connaître mais nul doute qu'ils entendront souvent parler de toi.

Manu, tu es venu de temps en temps me hurler quelque chose ou essayer de me faire peur (et tu as souvent réussi d'ailleurs) quelques fois au mauvais moment. Sur le coup, la réponse n'a pas toujours été des plus aimables. Avec le recul, ceci restera de très bons souvenirs.

Je ne peux pas dans ces remerciements ne pas parler de la troupe p110-116 (gardons l'ancienne nomenclature, un peu de nostalgie n'a jamais fait de mal) avec ces

anciens et actuels membres (procédons par ordre, ça sera plus simple), Amando, Benjamin, Cécile, Claire, Daphné, Gabrielle, Gwenaël, Jean-Christophe, Jean-Francois, Karine, Luis, Magali, Mirène, Nathalie, Paco, Pili, Sophie, Sylvie, Vincent, auxquels j'associe évidemment Yannick. J'espère n'oublier personne, si c'est le cas, qu'il(s) m'en excuse(nt). Même si je ne peux pas tous vous remercier individuellement ici, soyez assurés de ma reconnaissance et de ma gratitude pour votre aide et pour tous les bons moments passés dans les murs du SBGM.

Mirène, tu m'as initiée aux joies de la bataille navale géante (et en couleur s'il vous plait). Tu as guidé mes premiers pas dans l'univers insondable des puces. Cela a donné un nouveau souffle à ce travail. Pour ton aide et pour les pauses thé que nous avons partagées, je te remercie sincèrement. Bonne chance pour la suite.

Aux membres du club "tupperware" (les initié(e)s comprendront), nos routes se sont séparées. J'espère que les liens que nous avons tissés dans ces mémorables soirées ne disparaîtront pas complètement avec le temps. Sophie, merci pour les moments de rire au laboratoire et en dehors. Magali, tu as été assisté aux premières années de l'aventure et puis tu es partie gambader dans les champs de petits pois. Il reste sans doute des traces de notre période commune (déco de Noël, photos de petits lutins avec de drôles de bonnets rouges à clochettes...). Merci de ton amitié. Yo, nos routes se sont suivies pendant 4 ans puis tu as opéré un grand virage direction le nord au pays des tulipes. Je te souhaite bonne chance dans ton aventure dans l'univers impitoyable des brevets. Pour ton amitié, nos grandes discussions autour d'une tasse de thé ou en plein milieu d'une partie mémorable de badminton, nos excursions vélocypédiennes, sans parler de nos péripéties musicales, je t'adresse un grand MERCI.

Je n'oublie pas non plus ceux et celles qui ont suivi mes péripéties d'un peu plus loin (Claire-Odile, le "club" des agros etc...).

Il me reste encore quelques personnes à remercier. Eric, merci pour ton soutien sans faille tout au long de la dernière ligne droite (et parfois, crois moi, elle m'a parue très très très longue cette ligne droite!!!). Tes conseils et ton aide m'ont été plus que précieux. Je ne l'oublierai pas.

Enfin, les dernières lignes sont généralement consacrées à la famille. Je ne vais pas déroger à cette tradition. À mes parents et ma sœur, ces quelques mots ne suffiront pas pour vous témoigner ma reconnaissance et ma gratitude pour le soutien quotidien et les encouragements que vous m'avez prodigués tout au long de mes études et pendant ces années de thèse. Merci d'avoir supporté mes doutes mes états d'âme et d'avoir toujours été là pour moi. Je vous dédie ce travail, sans vous il n'aurait pas abouti.

Table des matières

<i>Liste des illustrations</i>	<i>iv</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>vii</i>
<i>Abréviations</i>	<i>viii</i>
Introduction	1
<i>I. La machinerie de transcription eucaryote.....</i>	<i>3</i>
I.1. Les trois ARN polymérases et leurs compositions.....	9
I.1.1. Les sous-unités homologues aux sous-unités eubactériennes $\beta'\beta$ et α	9
I.1.2. Les sous-unités communes.....	12
I.1.3. Les sous-unités qui ont un paralogue	23
I.1.4. Les sous-unités spécifiques.....	23
I.2. Structure des ARN polymérases.....	24
I.3. Modèle séquentiel versus modèle holoenzyme.....	25
<i>II. Architecture nucléaire et transcription.....</i>	<i>29</i>
II.1. Condensation de l'ADN - structure de la chromatine.....	29
II.2. Structure du nucléosome.....	31
II.2.1. Structure des histones.....	31
II.2.2. Structure cristallographique du nucléosome.....	36
II.3. Architecture nucléaire et transcription.....	39
II.3.1. Le nucléole.....	39
II.3.2. Les territoires chromosomiques.....	44
II.4. Les nucléosomes, un frein pour la transcription ?	47
II.4.1. Répression de la transcription par les nucléosomes.....	48
II.4.2. Structure chromatinienne et activation de l'expression.....	50
II.5. Chromatine et transcription, une évolution parallèle.....	52
<i>III. Transcription et modifications covalentes des histones.....</i>	<i>54</i>
III.1. Code des histones.....	57
III.2. L'acétylation des histones, un mécanisme lié à la transcription.....	58
III.2.1. Les histone acétyltransférases (HAT).....	59
III.2.2. Les histone déacétylases (HDAC).....	66
III.3. La méthylation des histones.....	68
III.4. La phosphorylation des histones.....	70
III.5. Histones et ubiquitine.....	71
<i>IV. Remodelage de la chromatine par des complexes ATP-dépendants.....</i>	<i>74</i>
IV.1. Le complexe SWI/SNF.....	74
IV.1.1. Isolement du complexe.....	74
IV.1.2. SWI/SNF et transcription.....	75
IV.2. Le complexe RSC (Remodels the Structure of Chromatin).....	76
IV.2.1. RSC, un homologue de SWI/SNF.....	76

IV.2.2. Un homologue humain pour RSC ?	82
IV.2.3. Rôle transcriptionnel de RSC.....	83
IV.2.4. RSC et le cycle cellulaire.....	85
IV.3. Les complexes de remodelage, une famille qui s'agrandit... ..	86
IV.3.1. La famille SWI/SNF.	89
IV.3.2. La famille ISWI.	89
IV.3.3. Type MI-2/CHD.....	92
IV.3.4. Type INO80.....	94
IV.4. Modes d'action possibles.	94
IV.4.1. Aspects mécanistiques.....	94
IV.4.2. Recrutements des machineries de remodelage.....	98
IV.5. Modifications covalentes et remodelage, des mécanismes interdépendants.....	102
Résultats-Discussion	101
<i>Étude de la fonction de l'interaction entre la sous-unité commune ABC27 et la grande sous-unité de l'ARN polymérase III.....</i>	<i>111</i>
<i>I. Mutagenèse.....</i>	<i>117</i>
<i>II. Interactions double-hybride et stabilité des enzymes mutantes</i>	<i>118</i>
<i>III. Discussion.....</i>	<i>122</i>
<i>Étude d'un mutant du complexe RSC chez S. cerevisiae.</i>	<i>125</i>
<i>I. Les interactions des ARN polymérases avec le complexe RSC.....</i>	<i>126</i>
<i>II. Effet de la mutation rsc4-myc sur la croissance.....</i>	<i>133</i>
II.1. Thermosensibilité du mutant rsc4-myc.....	134
II.2. Autres phénotypes du mutant rsc4-myc.....	137
<i>III. Étude de la transcription par les ARN polymérases I et III dans le mutant rsc4-myc....</i>	<i>139</i>
III.1. Effet de la délétion du gène RSC1.....	140
III.2. Effets de la mutation rsc4-myc sur la transcription par les ARN polymérases I et III.....	142
<i>IV. Étude du transcriptome</i>	<i>150</i>
IV.1. Principes d'utilisation des puces à ADN.....	150
IV.1.1. Obtention des cibles marquées et hybridation	151
IV.1.2. Les puces à ADN, leurs avantages et leurs limites	152
IV.1.3. Fabrication des puces.	154
IV.1.4. Acquisition des données et analyse.....	155
IV.2. Étude du transcriptome du mutant rsc4-myc.....	156
IV.2.1. Nombre de gènes affectés	157
IV.2.2. Types de gènes affectés	157
IV.2.3. RSC et le chromosome XII	166
IV.2.4. Une duplication du chromosome XII ?	173
IV.2.5. Chromosome XII, transcription par l'ARN polymérase I et ADNr.....	180
<i>V. Discussion.....</i>	<i>183</i>
V.1. Sensibilités du mutant rsc4-myc.....	183
V.2. Transcription par les ARN polymérases I et III.	185

V.3. Effet sur le transcriptome	187
V.4. Quelles explications pour l'induction transcriptionnelle des gènes du chromosome XII ?	188
V.5. Comparaison avec les données d'immunoprécipitation de chromatine.....	190
<i>Perspectives</i>	199
<i>Matériel et Méthodes</i>	203
<i>Références Bibliographiques</i>	217

Liste des illustrations

Figure 1 :	Structure cristallographique des ARN polymérase	p 7
Figure 2 :	Domaines conservés des grandes sous-unités d'ARN polymérase chez <i>S. cerevisiae</i>	p 10
Figure 3 :	Alignement de séquences de sous-unités de type ABC27	p 15
Figure 4 :	Structure tridimensionnelle de la sous-unité ABC27, communes aux trois ARN polymérase	p 16
Figure 5 :	Cartographie par la méthode du double-hybride des régions d'interactions des sous-unités communes avec les sous-unités de type β'	p 19
Figure 6 :	Région d'interaction de C160 avec ABC27	p 20
Figure 7 :	Modèle d'organisation du complexe d'initiation pol III	p 24
Figure 8 :	Condensation de la chromatine	p 27
Figure 9 :	Structure cristallographique des motifs de repliement histone (histone fold) au sein du nucléosome	p 29
Figure 10 :	Structure tridimensionnelle du nucléosome	p 34
Figure 11 :	Organisation en tandem de l'ADNr	p 36
Figure 12 :	Territoires chromosomiques	p 40
Figure 13 :	Représentation schématique des histones et des modifications covalentes des histones coeurs	p 50
Figure 14 :	Organisation schématique de la famille de protéines Polybromo	p 73
Figure 15 :	Structure des quatre classes d'ATPases des complexes de remodelage de la chromatine	p 79
Figure 16 :	Représentation schématique de complexes de type SWI/SNF	p 80

Figure 17 :	Représentation schématique de complexes de la famille ISWI.....	p 83
Figure 18 :	Le complexe humain NuRD.....	p 85
Figure 19 :	Le complexe INO80 de <i>S. cerevisiae</i>	p 85
Figure 20 :	Modèle d'action des complexes de type SWI/SNF	p 88
Figure 21 :	Modèle de recrutement séquentiel des machineries de remodelage et de transcription au niveau du gène <i>HO</i>	p 94
Figure 22 :	Modèle de recrutement séquentiel des machineries de remodelage et de transcription au niveau du gène de l'interféron β	p 98
Figure 23 :	Principe de la mutagenèse et de la sélection des mutants de la région d'interaction de C160 avec ABC27	p 103
Figure 24 :	Position des mutations de C160.....	p 104
Figure 25 :	Phénotype de croissance à 37°C des mutants de C160.....	p 105
Figure 26 :	Positionnements dans la grande sous-unité de l'ARN polymérase II des mutations introduites dans la grande sous-unité de l'ARN polymérase III.....	p 109
Figure 27 :	Interactions double-hybride entre la machinerie de transcription et le complexe RSC.....	p 115
Figure 28 :	Immunoprécipitation des ARN polymérases avec le complexe RSC	p 117
Figure 29 :	Perte de l'interaction double-hybride entre les protéines Rsc4 et ABC27	p 119
Figure 30 :	Thermosensibilité du mutant <i>rsc4-myc</i>	p 122
Figure 31 :	Défauts morphologiques du mutant <i>rsc4-myc</i>	p 123
Figure 32 :	Sensibilités du mutant <i>rsc4-myc</i>	p 125
Figure 33 :	Phénotype de croissance de la délétion du gène <i>RSC1</i>	p 128
Figure 34:	Marquage des ARN néosynthétisés au ^{33}P	p 130

Figure 35 :	Courbes de croissance du mutant <i>rsc4-myc</i>	p 131
Figure 36 :	Maturation des ARN ribosomiques	p 133
Figure 37 :	Détection par Northern blot des ARN ribosomiques.....	p 134
Figure 38 :	Détection par Northern blot de l'ARNt lysine (UUU) et son précurseur	p 136
Figure 39 :	Principes des puces à ADN	p 140
Figure 40 :	Diagramme de Venn des gènes induits et réprimés.....	p 145
Figure 41 :	Image d'hybridation sur puces à ADN.....	p 153
Figure 42 :	Carte chromosomique des ratios d'expression génique	p 155
Figure 43 :	Pourcentage de gènes induits ou réprimés par chromosome	p 157
Figure 44 :	Ratios d'expression moyens par chromosome	p 158
Figure 45 :	Caryotype d'un mutant <i>rsc4-myc</i>	p 161
Figure 46 :	Descendance du mutant <i>rsc4-myc</i> dans le cas d'une duplication du chromosome XII	p 163
Figure 47 :	Modèle de l'induction de la transcription des gènes du chromosome XII : rôle de l'ADN ribosomique.....	p 165
Figure 48 :	Analyse comparative des sites de liaison intergéniques du complexe RSC avec le transcriptome du mutant <i>rsc4-myc</i>	P 175

Liste des tableaux

Tableau I :	Compositions sous-unitaires des ARN polymérases bactériennes, archéobactériennes et eucaryotes	p 5
Tableau II :	Gènes d'histones	p 31
Tableau III :	Compositions des complexes de remodelage de la chromatine de la famille SWI/SNF.....	p 71
Tableau IV :	Positions des différentes mutations de C160 et de l'acide aminé correspondant dans la sous-unité B220	p 108
Tableau V :	Nombre de gènes induits et réprimés dans le mutant <i>rsc4-myc</i>	p 146
Tableau VI :	Les 15 gènes dont la transcription est la plus fortement stimulée ou réprimée dans le mutant <i>rsc4-myc</i> à 30°C.....	p 147
Tableau VII :	Les 15 gènes dont la transcription est la plus fortement stimulée ou réprimée dans le mutant <i>rsc4-myc</i> à 37°C.....	p 149
Tableau VIII :	Comparaison des sites de liaisons intergéniques du complexe RSC et du transcriptome du mutant <i>rsc4-myc</i>	p 177
Tableau IX :	Souches de levure construites et utilisées	p 186
Tableau X :	Plasmides construits et utilisés	p 188
Tableau XI :	Oligonucléotides utilisés pour la construction des souches étiquetées HA et Myc.....	p 191
Tableau XII :	Oligonucléotides utilisés en Northern blot.....	p 196

Abréviations

aa-dUTP : amino-allyl déoxyuridine triphosphate

ADNr : ADN ribosomique

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine Triphosphate

ChIP : chromatin immunoprecipitation / immunoprécipitation de chromatine

Cy3 : Cyanine 3

Cy5 : Cyanine 5

DMSO : diméthylsulfoxyde

DNase : désoxyribonucléase

DO : densité optique

HAT : histone acétyltransférase

HDAC : histone déacétylase

HMT : histone méthylase

kDa : kilo Dalton

Mda : méga Dalton

pol I : ARN polymérase I

pol II : ARN polymérase II

pol III : ARN polymérase III

ORF : Open Reading Frame/cadre ouvert de lecture

pb : paires de bases

RNase : ribonucléase

rpm : rotation par minutes

snARN : petit ARN nucléaire (small nuclear RNA)

snoARN : petit ARN nucléolaire (small nucleolar RNA)

TE : Tris-EDTA

5-FOA : acide 5-fluoroorotique

6-AzaU : 6-aza-uracile

Les gènes sont notés de la façon suivante :

- les allèles dominants sont en majuscules et en italique. Le plus souvent ils correspondent à des allèles sauvages.

- Les allèles récessifs sont en minuscules et en italiques.

Par exemple le gène codant la grande sous-unité de l'ARN polymérase II sera écrit *RPB1*. L'allèle *rpb1-1* correspond à une mutation récessive dans le gène *RPB1*.

Pour la notation des protéines, la nomenclature utilisée : la première lettre en majuscule et les suivantes en minuscules (par exemple Gcn5). Toutefois, les protéines appartenant à plusieurs ARN polymérases seront notées différemment : les lettres (A, B et C) se réfèrent aux ARN polymérases auxquelles elles appartiennent et le chiffre indique la masse moléculaire apparente en kDa de la sous-unité. Par exemple, le nom AC40 indique que la protéine appartient aux ARN polymérases I et III et que sa masse moléculaire est 40 kDa.

Les outils génétiques, ainsi que sa facilité de culture, ont contribué à imposer au cours des dernières décennies la levure *Saccharomyces cerevisiae*, premier organisme eucaryote dont le génome a été intégralement séquencé (Goffeau *et al.*, 1996), comme un modèle d'étude de la cellule eucaryote. Les quelques 6000 gènes présents dans le génome de cet organisme renferment les informations nécessaires à la réalisation des processus fondamentaux du fonctionnement cellulaire, processus extrêmement conservés au cours de l'évolution.

Le génome de la levure, comme celui des autres eucaryotes, a une structure plus complexe que celui des bactéries. Tout d'abord, l'ADN est condensé dans l'espace nucléaire sous forme de chromatine. Tout en structurant le génome, la chromatine doit laisser un accès à l'ADN. On trouve chez les eucaryotes de nombreux complexes protéines qui ont pour rôle de lever la barrière chromatinienne mais aussi de participer au maintien de cette structure. La modulation de cette structure fait partie intégrante des mécanismes de régulation de l'expression des gènes.

Alors qu'une ARN polymérase est suffisante pour transcrire la totalité du génome chez les bactéries, trois enzymes différentes sont requises pour transcrire l'intégralité du génome eucaryote. L'appareil transcriptionnel de *S. cerevisiae* est, à ce jour, le mieux caractérisé chez les eucaryotes. Tous les gènes codant les sous-unités d'ARN polymérases ont été identifiés. Un nouveau pas a été franchi récemment avec la résolution de la structure de l'ARN polymérase II (Cramer *et al.*, 2000 ; Cramer *et al.*, 2001). La parution de cette structure a marqué un tournant décisif dans l'étude des mécanismes transcriptionnels.

Je me suis intéressée au cours de ces années à deux aspects de la transcription. Dans un premier temps, j'ai poursuivi l'étude entamée au cours de mon DEA. Nous nous sommes intéressés à la fonction de l'interaction qui existe entre deux sous-unités de l'ARN polymérase III, C160 et ABC27. Nous n'avons obtenu que peu de résultats supplémentaires. J'ai toutefois choisi de les présenter brièvement dans la

première partie du chapitre résultats. N'ayant pas obtenu de mutants avec des phénotypes marqué, nous avons préféré ne pas poursuivre cette étude.

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons focalisé notre attention sur les liens entre la transcription et le remodelage de la structure de la chromatine. En effet, des interactions entre les machineries de transcription et le complexe de remodelage de la chromatine RSC ont été découvertes au laboratoire. Il m'a été proposé d'étudier ces interactions et de rechercher des défauts transcriptionnels liés à une mutation dans une des sous-unités du complexe RSC. Ce travail nous a permis d'isoler un mutant de la protéine Rsc4 dont l'étude du transcriptome a révélé un comportement transcriptionnel très particulier.

L'introduction de ce manuscrit est structurée en quatre parties. Le premier chapitre est consacré à l'appareil transcriptionnel de *S. cerevisiae* et plus particulièrement à la fonction des différents composants de l'ARN polymérase III. Dans un deuxième chapitre, j'ai souhaité aborder certains aspects de l'architecture nucléaire, notamment la structure chromatinienne de l'ADN, et leurs implications sur le déroulement de la transcription. En particulier, il m'a semblé important de montrer que la structure chromatinienne de l'ADN constitue un moyen de régulation de la transcription par la modulation de l'accessibilité de l'ADN à la machinerie de transcription. Les deux dernières parties de cette introduction sont consacrées aux modalités de remaniements de la chromatine. Le chapitre III traite des modifications post-traductionnelles des histones. Le chapitre IV est quant à lui centré sur les complexes de remodelage de la chromatine du type SWI/SNF. Ces deux grands mécanismes de remodelage ne sont pas indépendants et sont en fait étroitement imbriqués. C'est pourquoi, bien que mon sujet n'ai pas directement trait aux modifications post-transcriptionnelles des histones, j'ai jugé opportun de présenter les principales modifications des histones et leurs conséquences transcriptionnelles.

La transcription est la première étape de l'expression des gènes. Elle consiste en la synthèse d'ARN à partir d'une matrice d'ADN. C'est un processus extrêmement régulé dont le bon déroulement est absolument nécessaire au fonctionnement correct d'une cellule. Des dysfonctionnements ou des dérégulations du processus transcriptionnel sont en effet à l'origine de nombreuses maladies (pour revues, voir Aso *et al.*, 1996 ; Parvin and Young, 1998). La transcription peut être décomposée en trois étapes majeures : **l'initiation**, qui comprend l'étape d'assemblage des différents composants de la machinerie sur les promoteurs et la formation de la première liaison phosphodiester, **l'élongation**, phase d'allongement du transcrit, et enfin **la terminaison** pendant laquelle le transcrit néosynthétisé et l'ARN polymérase sont relargués de l'ADN. La régulation de l'expression des gènes s'effectue non seulement au niveau de la machinerie transcriptionnelle elle-même mais également à des niveaux supérieurs comme la structure de la chromatine ou "l'architecture" du noyau.

La transcription est réalisée par les ARN polymérases (pol) ADN dépendantes. Ces enzymes se répartissent en deux classes qui n'ont aucun rapport de séquences entre elles. La classe I comprend les ARN polymérases nucléaires des eucaryotes et les enzymes bactériennes (eubactéries et archéobactéries). Ces ARN polymérases sont multimériques et de haute masse moléculaire. La classe II est constituée par les enzymes monomériques mitochondriales et celles de certains virus. Elle ne sera pas abordée dans le cadre de cette introduction.

I. La machinerie de transcription eucaryote.

Chez les eubactéries, il n'existe qu'une seule ARN polymérase capable de transcrire l'intégralité du génome. L'enzyme, dont la masse moléculaire est d'environ 450 kDa, existe sous deux formes : l'enzyme fondamentale et l'holoenzyme. L'enzyme fondamentale est un pentamère constitué de sous-unités ω , β , β' et d'un dimère α_2 .

Elle est capable d'effectuer l'élongation du transcrit mais est incapable de reconnaître le promoteur et d'initier la synthèse. La sous-unité ω est non essentielle et sa fonction est inconnue. Plusieurs facteurs de transcription σ sont spécialisés dans la reconnaissance des promoteurs. L'holoenzyme résulte de l'association d'un facteur σ avec l'enzyme fondamentale.

La machinerie transcriptionnelle eucaryote contient des sous-unités protéiques homologues à β' , β , α et ω mais n'a pas d'équivalent à σ . Elle se démarque du système eubactérien par sa plus grande complexité. Trois types d'ARN polymérase ont été mis en évidence. Le tableau I présente les compositions sous-unitaires des enzymes de *Escherichia coli*, *Methanococcus jannashii* et *Saccharomyces cerevisiae*. Chez les eucaryotes, les gènes sont répartis en trois classes en fonction de l'ARN polymérase qui les transcrit. L'ARN polymérase I synthétise le précurseur 35S des ARN ribosomiques. L'ARN polymérase II produit les ARN messagers et la plupart des ARN non traduits (snARN, snoARN). Enfin, l'ARN polymérase III assure la transcription des ARN de transfert et de l'ARN 5S. Trois petits ARN non traduits (faisant partie de la RNaseP, du spliceosome (U6) et de la particule de sécrétion SRP) sont également transcrits par la pol III dans la totalité des eucaryotes étudiés jusqu'à présent (White, 1998). Le système de transcription archéobactérien est intermédiaire entre celui des eubactéries et celui des eucaryotes. Comme les eubactéries, les archéobactéries ne possèdent qu'une seule ARN polymérase mais dont la composition se rapproche de celles des ARN polymérases eucaryotes. Onze des treize polypeptides dont est formée l'enzyme archéobactérienne ont un homologue eucaryote.

Les ARN polymérases de *S. cerevisiae* sont des complexes hétéromultimériques dont la masse moléculaire varie entre 500 et 700 kDa. Bien que leurs masses soient similaires à celle de l'enzyme bactérienne, les ARN polymérases I, II et III de *S. cerevisiae* ont une composition sous-unitaire beaucoup plus complexe. Elles sont

constituées respectivement de 14, 12 et 17 sous-unités (tableau I). Ces trois enzymes s'organisent autour de deux grandes sous-unités, homologues aux sous-unités

eubactériennes β et β' . Une série de protéines de plus petite taille vient s'assembler sur ces deux grandes sous-unités. Les trois ARN polymérases de *S. cerevisiae* ont été purifiées et tous les gènes codant les différentes sous-unités ont été clonés. Les sous-unités sont nommées par convention en fonction de l'ARN polymérase auxquelles elles appartiennent (A pour la pol I, B pour la pol II, C pour la pol III) et de leur masse moléculaire apparente. Elles se répartissent en quatre groupes en fonction de leurs homologues avec d'autres sous-unités (tableau I) :

- (1) les sous-unités homologues aux sous-unités eubactériennes β' , β et α ,
- (2) les sous-unités communes aux trois enzymes,
- (3) les sous-unités qui ont un paralogue
- (4) les sous-unités spécifiques.

Les structures tridimensionnelles de l'ARN polymérase de la bactérie *Escherichia Coli* et de l'ARN polymérase II de la levure *S. cerevisiae*, présentées sur la figure 1, ont été résolues (Cramer *et al.*, 2000 ; Cramer *et al.*, 2001 ; Vassylyev *et al.*, 2002). Ces deux enzymes ont des structures très similaires. Le cœur de l'enzyme est constitué par des sous-unités de type β et β' . Ceci laisse par conséquent supposer une conservation évolutive des mécanismes transcriptionnels de base. Les ARN polymérases ont la forme d'une pince dont les bras sont formés par les sous-unités β ou β' . Le site actif est situé au fond d'un sillon, formé par les deux grandes sous-unités et dans lequel s'engage l'ADN.

Les fonctions des différentes sous-unités communes et homologues aux sous-unités eubactériennes sont détaillées dans le chapitre I.1. La première partie de ma thèse a porté sur l'ARN polymérase III, j'ai choisi d'aborder uniquement la fonction des sous-unités des groupes 3 et 4 de cette enzyme.

I.1. Les trois ARN polymérases et leurs compositions.

I.1.1. Les sous-unités homologues aux sous-unités eubactériennes β' β et α .

I.1.1.1. Les grandes sous-unités.

Les deux grandes sous-unités des trois ARN polymérases sont homologues aux sous-unités eubactériennes β' et β . La comparaison des séquences des protéines eubactériennes, archéobactériennes, et eucaryotes a permis de définir une série de régions conservées au cours de l'évolution (figure 2). Ainsi, 8 (notés de **a** à **h**) et 10 motifs (notés de **A** à **J**) ont été définis respectivement dans les sous-unités de type β' (A190, B220 et C160) et dans celle de type β (A135, B150, C128). Ces blocs conservés se répartissent autour du canal central et du site actif et font partie de modules structuraux importants pour le fonctionnement de l'ARN polymérase (Cramer *et al.*, 2000). Ces différents modules à l'exception, du site actif, ne seront pas davantage détaillés dans cette introduction.

Le domaine **d** est le mieux conservé. Il contient notamment le motif NADFDGD, invariant dans toutes les ARN polymérases connues à ce jour. Une étude de l'ARN polymérase bactérienne a permis de localiser le site de liaison de l'ion magnésium, essentiel à l'activité de l'enzyme, à proximité de ce motif (Zaychikov *et al.*, 1996). De plus, ce motif et un ion Mg^{2+} , lié par les trois acides aspartiques du motif, ont été localisés au fond du sillon dans la structure de l'ARN polymérase II eucaryote (Cramer *et al.*, 2000). La mutation *rpc160-112* correspond à une double substitution T506I N509Y à proximité du motif NADFDGD dans la grande sous-unité de l'ARN polymérase III. Ce mutant est affecté dans le processus catalytique (Dieci *et al.*, 1995). Étant donnée la forte conservation de ce domaine dans toutes les sous-unités de type β' , il est probable que ce motif porte l'activité catalytique. Le domaine **f** des sous-unités de type β' appartient aussi au site catalytique. L' α -amanitine est une toxine produite par l'amanite phalloïde qui inhibe la synthèse des ARN en bloquant le processus de translocation de l'enzyme (De Mercoyrol *et al.*, 1989 ; Bushnell *et al.*, 2002). L'ARN polymérase II est sensible à cette toxine. En revanche,

la pol I, à l'exception de celle de *S. cerevisiae*, n'est pas affectée par l' α -amanitine. La sensibilité de la pol III est variable suivant les organismes. Les mutations conférant une résistance à l' α -amanitine sont localisées dans le domaine f (Bartolomei and Corden, 1987 ; Chen *et al.*, 1993 ; Bartolomei and Corden, 1995 ; Severinov *et al.*, 1995). L'étude du mutant conditionnel *rpc160-270* (D829A R830A) de la grande sous-unité de la pol III de *S. cerevisiae* a confirmé le rôle du domaine f dans le processus de translocation de l'enzyme. Ce mutant est incapable de réaliser la transition entre la phase abortive et la phase d'élongation (Thuillier *et al.*, 1996), étape qui fait intervenir une translocation de l'enzyme. De plus, plusieurs supprimeurs du mutant du domaine d *rpc160-112* sont mutés dans le domaine f (Rozenfeld and Thuriaux, 2001 ; Bushnell *et al.*, 2002). La plupart de ces mutants sont situés à proximité du site de liaison de l' α -amanitine (Rozenfeld and Thuriaux, 2001 ; Bushnell *et al.*, 2002). Le domaine f fait donc partie du site catalytique et est impliqué dans les processus d'élongation.

Le domaine a semble important pour l'intégrité structurale de l'enzyme, tout du moins dans le cas de l'ARN polymérase III. En effet, la mutation T69N dans la grande sous-unité C160 provoque la dissociation simultanée des sous-unités C82, C34 et C31 lors de la purification de la pol III mutante (Werner *et al.*, 1992).

La grande sous-unité de la l'ARN polymérase II possède en plus à son extrémité carboxy-terminale une extension, dite Carboxy Terminal Domain (CTD), constituée de répétitions de la séquence "Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser". Bien que le nombre de répétition varie d'un organisme à l'autre (26 répétitions chez la levure, 52 chez l'homme), ce domaine est essentiel. Chez *S. cerevisiae*, des délétions partielles du CTD induisent un phénotype thermosensible (Nonet and Young, 1989). Le CTD contient des sites de phosphorylation importants pour la régulation de l'activité de l'enzyme et le couplage aux activités de protection d'épissage des ARN messagers (revues dans Corden and Patturajan, 1997 ; Steinmetz, 1997 ; Oelgeschlager, 2002 ; Proudfoot *et al.*, 2002).

I.1.1.2. Les sous-unités de type α , des sous-unités d'assemblage.

Les pol I et III partagent les sous-unités AC40 et AC19. Leurs paralogues dans la pol II sont respectivement B44.5 et B12.2. Toutes ces protéines ont des similitudes avec la sous-unité bactérienne α . La formation d'un dimère α_2 est la première étape de l'assemblage de l'ARN polymérase bactérienne. Ce dimère s'assemble ensuite avec les sous-unités β puis β' . De même, les protéines B44.5 et B12.2 forment un dimère qui s'assemble avec la grande sous-unité B150. Cet hétérodimère a une position dans la pol II similaire à celui du dimère α_2 dans l'enzyme bactérienne (Kimura *et al.*, 1997 ; Cramer *et al.*, 2000). Il se situe à l'arrière de l'enzyme au niveau de la charnière entre les deux grandes sous-unités. Les protéines AC40 et AC19 interagissent entre elles (Lalo *et al.*, 1993) et avec la deuxième grande sous-unité A135 (Flores *et al.*, 1999), ce qui suggère que les sous-unités AC40 et AC19 assurent des fonctions similaires à celles du dimère B44.5-B12.2 dans la pol II. La sous-unité AC40 joue un rôle essentiel dans l'assemblage de la pol I. A température restrictive, un mutant thermosensible de la sous-unité AC40 est incapable d'assembler des sous-unités néo-synthétisées de l'ARN polymérase I. Par contre, les enzymes préexistantes sont stables et fonctionnelles (Mann *et al.*, 1987).

I.1.2. Les sous-unités communes.

Les trois ARN polymérases partagent 5 sous-unités (tableau I). Toutes, à l'exception d'ABC14.5, ont un orthologue archéobactérien. La fonction de ces sous-unités est mal connue. Il a été proposé qu'elles puissent jouer un rôle dans l'assemblage, dans la stabilité de l'enzyme ou dans la coordination des trois systèmes de transcription. Des mutants de sous-unités communes affectant plus particulièrement un des trois systèmes de transcription ont été isolés (Gadal *et al.*, 1999 ; Rubbi *et al.*, 1999). Ceci suggère que les sous-unités communes assurent des fonctions communes aux trois ARN polymérases, mais aussi peut-être des fonctions spécifiques d'un système. En effet, bien que les trois ARN polymérases aient

probablement des structures très proches, elles sont pourtant distinctes et il est possible que la mutation d'une de ces sous-unités commune affecte principalement une des trois enzymes. D'autre part, les environnements de chacune des ARN polymérases sont différents, ce qui pourrait également expliquer qu'une enzyme soit prioritairement affectée.

I.1.2.1. ABC10 α et ABC10 β , des sous-unités d'assemblage.

Les sous-unités ABC10 α et ABC10 β interagissent avec B44.5 et sont situées sur la face arrière de l'ARN polymérase II (Cramer *et al.*, 2000). Des analyses génétiques et par double-hybride ont suggéré que ces deux protéines interagissent également avec les grandes sous-unités (Lalo *et al.*, 1993 ; Flores *et al.*, 1999). L'ensemble des contacts engagés par ces deux sous-unités fait penser qu'elles pourraient intervenir dans l'assemblage et le maintien de la structure des trois ARN polymérases. L'étude d'un mutant d'ABC10 α a montré que cette sous-unité est critique pour l'assemblage de la pol III (Rubbi *et al.*, 1999). De plus, elle est limitante pour la croissance comme le montre les propriétés des mutants hétérozygotes *rpb12 Δ /RPB12* (Rubbi *et al.*, 1999). Des mutations de la sous-unité ABC10 β affectant prioritairement la pol I ont également été isolés dans le motif HVDLIEK, spécifique des eucaryotes. L'analyse de ces mutants a montré que la quantité d'ARN polymérase I est inférieure à celle d'un sauvage et que la grande sous-unité de l'enzyme A190 est dégradée (Gadal *et al.*, 1999). La stabilité des grandes sous-unités B220 et C160 n'est pas affectée, ce qui indique que la sous-unité ABC10 β serait plus spécifiquement requise pour l'assemblage et la stabilité de la pol I.

I.1.2.2. ABC14.5, une sous-unité de fonction mal comprise.

La sous-unité ABC14.5 est typiquement eucaryote mais sa séquence est relativement peu conservée. Des expériences de complémentation hétérospécifique

ont montré que la sous-unité humaine hRpb8 est partiellement fonctionnelle chez *S. cerevisiae* (Shpakovski *et al.*, 1995). La délétion du gène *RPB8* peut être complémentée par l'homologue humain à 30°C mais pas à 37°C. En revanche, malgré une meilleure conservation globale, les sous-unités de *Schizosaccharomyces pombe* et *S. cerevisiae* ne sont pas interchangeables (Voutsina *et al.*, 1999). Il semble que la non complémentation soit essentiellement due à un défaut dans la pol III. En effet, une complémentation partielle est possible lorsque la grande sous-unité de la pol III, C160, est conjointement surexprimée alors que la surexpression des grandes sous-unités de la pol I et de la pol II n'a pas d'effet (Voutsina *et al.*, 1999). L'étude biochimique de cette pol III chimérique a révélé que l'activité transcriptionnelle *in vitro* n'est pas altérée, mais que l'enzyme présente un défaut d'assemblage. En effet, la sous-unité Rpb8 de *S. pombe* s'intègre mal dans l'enzyme et la surexpression de C160 permet de corriger partiellement ce défaut (Voutsina *et al.*, 1999).

Du fait que les sous-unités de type ABC14.5 sont spécifiquement eucaryotes, il a été proposé qu'elles jouent un rôle dans l'import nucléaire des ARN polymérases. Une interaction double-hybride entre la sous-unité ABC14.5 et la nucléoporine Nup82 a été démontrée (Briand *et al.*, 2001b). Dans le mutant *rpb8-L122D*, les quantités de grandes sous-unités détectées dans le noyau sont réduites à température restrictive, mais il n'y a pas d'accumulation concomitante de ces sous-unités dans le cytoplasme. Ces résultats peuvent s'expliquer par une dégradation rapide des grandes sous-unités qui ne sont pas importées dans le noyau (Briand *et al.*, 2001b). Il est donc possible qu'ABC14.5 joue un rôle de stabilisation et d'import des ARN polymérases dans le compartiment nucléaire.

I.1.2.3. ABC23, un membre du site actif ?

La sous-unité ABC23 présente des similitudes de séquence et de structure avec la sous-unité bactérienne ω (Minakhin *et al.*, 2001). Elle est essentielle à la fonction catalytique de la pol I. L'analyse biochimique d'une forme incomplète de la pol I, dite

pol I Δ , dans laquelle les sous-unités ABC23, A14 et A43 sont absentes, montre que cette enzyme est incapable de catalyser la formation d'une liaison phosphodiester. La protéine ABC23 recombinante peut être ajoutée et permet de reconstituer une enzyme fonctionnelle. Cette sous-unité ferait donc partie du cœur catalytique de la pol I ou serait nécessaire à l'intégrité structurale du site actif (Lanzendörfer *et al.*, 1997). La résolution de la structure de la pol II a, là encore, apporté des éléments importants sur la fonction de la protéine. ABC23 fait partie, avec les sous-unités B220 et B150, d'un domaine structural particulier, le "verrou" (ou clamp). Le verrou est une partie mobile de l'enzyme dont une fonction serait de basculer vers l'ADN quand il est dans le chenal et ainsi de stabiliser le complexe sur l'ADN pendant les phases d'initiation et d'élongation (Cramer *et al.*, 2001).

Par ailleurs, la sous-unité ABC23 pourrait aussi participer à l'assemblage des complexes. Nouraini et collaborateurs ont montré que cette sous-unité est nécessaire à l'assemblage des ARN polymérases I et II ainsi qu'à la stabilité des grandes sous-unités A190 et B220 (Nouraini *et al.*, 1996). L'étude biochimique du mutant *rpo26-31* a permis de mettre en évidence une dégradation des sous-unités de type β' et un défaut d'assemblage des pol II néosynthétisées après passage à température restrictive. Comme dans le cas de la sous-unité AC40, la stabilité des complexes préformés à température permissive n'est pas affectée, mais l'assemblage de nouveaux complexes est entravé (Nouraini *et al.*, 1996 ; Nouraini *et al.*, 1997).

I.1.2.4. ABC27, un pont avec les activateurs transcriptionnels.

La sous-unité ABC27 est homologue à la sous-unité RpoH des archéobactéries (figure 3). Seul le tiers C-terminal de la protéine est présent chez les archéobactéries (Klenk *et al.*, 1992 ; Sentenac *et al.*, 1992). La protéine ABC27 est bien conservée évolutivement. Malgré cela, cette sous-unité est la seule sous-unité commune qui ne peut pas être échangée *in vivo* chez *S. cerevisiae* par son homologue humain

(Shpakovski *et al.*, 1995). Par contre, les sous-unités de *S. pombe* et *S. cerevisiae* sont interchangeables (Shpakovski *et al.*, 2000).

Les structures cristallographiques de sous-unités RpoH et ABC27 ont été résolues (figure 4 ; Todone *et al.*, 2000 ; Yee *et al.*, 2000). Cette protéine a une structure bipartite en forme d'haltère. La sous-unité archébactérienne RpoH et la partie C-terminale de la sous-unité eucaryote montrent des similitudes structurales comme le laisse présager la conservation des séquences primaires. Ceci suggère que la sous-unité ABC27 a deux fonctions, l'une conservée chez les archébactéries et l'autre propre aux eucaryotes et assuré par le domaine N-terminal. La protéine ABC27 interagit avec une région conservée présente dans les trois grandes sous-unités A190, B220 et C160 (figures 5 et 6). La région d'interaction des grandes sous-unités avec ABC27 correspond à une région en amont et chevauchant partiellement le domaine **h** des grandes sous-unités (Flores *et al.*, 1999 ; Cramer *et al.*, 2001). Il est donc probable que ABC27 occupe la même place au sein des trois complexes. En concordance avec les données de structure, les mutations qui entraînent des pertes d'interactions en double-hybride entre ABC27 et les grandes sous-unités sont localisées dans la partie C-terminale de la protéine (travaux réalisés par F. Navarro au laboratoire). Ce domaine d'interaction est conservé chez les eucaryotes et les archébactéries mais ne l'est pas chez les eubactéries conformément à la conservation évolutive de la partie carboxy-terminale d'ABC27 (figure 6). Toutefois la présence de la partie C-terminale chez les archébactéries indique donc que la fonction de ce domaine n'est probablement pas uniquement de permettre l'ancrage de la protéine dans les ARN polymérases. La boucle qui sépare les deux lobes est essentielle à la fonction de la protéine. En effet, des mutations dans cette boucle entraînent des défauts de croissance très marqués (F. Navarro, données non publiées).

L'analyse de la structure tridimensionnelle de l'ARN polymérase II (voir I.3) a apporté des informations importantes sur les fonctions possibles d'ABC27. Cette sous-unité est localisée à l'avant de l'ARN polymérase, à l'extrémité du canal et à proximité de l'ADN. Des contacts entre l'AND et ABC27 ont été cartographiés entre les positions +5 et +15 en amont de la bulle de transcription (Bartholomew *et al.*, 1993 ; Kim *et al.*, 1997). La structure de la sous-unité ABC27 intégrée dans l'enzyme est

proche de celle qu'elle adopte à l'état libre (Cramer *et al.*, 2000). Son domaine N-terminal est légèrement basculé à l'intérieur du complexe vers le sillon dans lequel passe l'ADN. Ceci indique que la partie N-terminale d'ABC27 pourrait être mobile et venir au contact de l'ADN. Beaucoup de résidus conservés de la partie N-terminale sont situés dans le canal central. Il a été proposé que ces résidus engagent des interactions avec l'ADN et que la protéine ABC27 participe à fermeture du complexe sur l'ADN. Notamment, deux prolines, extrêmement conservées, font face à l'ADN. Compte tenu de leur disposition et de leur distance par rapport à l'ADN, il est probable que ces prolines constituent un point de contact avec l'ADN (Cramer *et al.*, 2000 ; Gnatt *et al.*, 2001).

Par ailleurs, il a été démontré qu'ABC27 interagit physiquement par son domaine N-terminal avec les facteurs généraux TFIIB et TFIIF ainsi qu'avec des activateurs de la transcription par la pol II (Cheong *et al.*, 1995 ; Lin *et al.*, 1997 ; Dorjsuren *et al.*, 1998 ; Miyao and Woychik, 1998 ; Wei *et al.*, 2001), ce qui pourrait participer à la stabilisation du complexe de transcription lors de l'initiation.

Il semble qu'ABC27 ne soit pas impliquée dans le processus catalytique (F. Navarro, manuscrit en préparation). Contrairement à d'autres sous-unités communes, la protéine ABC27 ne semble pas participer à l'assemblage et à la stabilité des ARN polymérases. Aucun des mutants caractérisés ne présente de défaut d'assemblage ni de diminution de la quantité d'ARN polymérase.

En conclusion, la fonction des différentes sous-unités communes n'est pas encore bien établie. Ces sous-unités, à l'exception d'ABC27, semblent intervenir dans l'assemblage et la stabilité des ARN polymérases. Il est probable que ces protéines assurent d'autres rôles dans la transcription. Aucune co-régulation des trois systèmes de transcription faisant intervenir des sous-unités communes n'a été établie à ce jour.

I.1.3. Les sous-unités qui ont un paralogue

Parmi les protéines composant les ARN polymérases, on trouve trois séries de paralogues. Il s'agit de : (1) A14, B32, C17, (2) A43, B16, C25 et (3) A12.2, B12.6, C11.

Des études sont en cours au laboratoire sur les sous-unités C25 et C17 et permettront certainement d'associer une fonction à ces sous-unités. Une fonction dans l'activité de clivage a été attribuée à la sous-unité C11 grâce à l'étude biochimique d'une ARN polymérase mutante dépourvue de cette sous-unité (pol III Δ C11). La pol III contrairement aux deux autres ARN polymérases possède une activité intrinsèque de clivage de l'ARN et ne nécessite pas *in vitro* l'addition d'un cofacteur pour stimuler cette activité. La sous-unité C11 est essentielle à la viabilité cellulaire. Elle peut être remplacée par son homologue de *S. pombe* SpC11. Toutefois, lors de la purification de cette enzyme chimérique, la protéine SpC11 se dissocie de l'enzyme. La perte de l'activité de clivage est concomitante à la dissociation de la protéine. La pol III Δ C11 présente également un défaut de terminaison *in vitro* (Chedin *et al.*, 1998b). Le site catalytique de l'activité de clivage n'a pas été identifié. Cependant, la participation de la sous-unité C11 à cette activité indique soit qu'elle est porteuse de cette activité, soit qu'elle agit comme un cofacteur nécessaire à la stimulation de l'activité de clivage dont le site actif est porté par une autre sous-unité. L'orthologue de C11 dans la pol II, B12.6, intervient également dans l'activité de clivage mais n'en est pas porteuse (Awrey *et al.*, 1997).

I.1.4. Les sous-unités spécifiques.

Chaque ARN polymérase possède un jeu de sous-unités spécifiques. L'ARN polymérase III en contient 5 qui, contrairement à celles des ARN polymérase I et II, sont toutes essentielles à la viabilité cellulaire (revue dans Chedin *et al.*, 1998a). Les sous-unités C53 et C37 interagissent en double-hybride (Flores *et al.*, 1999). La fonction de ce dimère est encore inconnue. Les sous-unités C82, C34 et C31 forment un sous-complexe au sein de l'enzyme. Ces trois sous-unités interagissent deux à

deux en double-hybride (Werner *et al.*, 1993). Leurs orthologues humains hRPC62, hRPC39, hRPC32 forment un sous-complexe comparable (Wang and Roeder, 1997). D'autre part, une mutation dans le domaine **a** de C160 entraîne la dissociation simultanée de ces trois polypeptides lors de la purification de l'enzyme mutante (Werner *et al.*, 1992). Les sous-unités C34 de la pol III et TFIIB70 du facteur général de transcription de classe III TFIIB, de même que leurs homologues humains, interagissent (Werner *et al.*, 1993 ; Khoo *et al.*, 1994 ; Wang and Roeder, 1997). La sous-unité C31 joue un rôle dans l'initiation de la transcription (Thuillier *et al.*, 1995). De même, l'étude biochimique de mutants de la sous-unité C34 a permis de mettre en évidence son rôle dans le recrutement de la pol III par le complexe de préinitiation ainsi que dans la formation du complexe ouvert de transcription (Brun *et al.*, 1997). Ce sous-complexe C31•C34•C82 intervient donc vraisemblablement lors des premières étapes de la transcription.

I.2. Structure des ARN polymérases.

La structure cristallographique de l'ARN polymérase II de *S. cerevisiae* a été résolue à 2,8 Å (figure 1 ; Cramer *et al.*, 2000 ; Cramer *et al.*, 2001). Les sous-unités B32 (Rpb4) et B16 (Rpb7) n'ont pas pu être cristallisées avec le reste du complexe. Leur position n'est pas bien établie. Par contre les autres sous-unités ont pu être positionnées au sein de l'enzyme. Les régions d'interactions entre les différentes sous-unités ont pu être cartographiées. L'enzyme s'organise autour des deux grandes sous-unités qui s'imbriquent l'une dans l'autre et forme une "poche" qui renferme le site catalytique. Les sous-unités B44 (Rpb3) et B12.5 (Rpb11) occupent la face arrière du complexe d'une façon similaire à celle de l'homodimère α_2 dans l'enzyme bactérienne. Les enzymes bactériennes et de levure ont des structures quaternaires très similaires. L'alignement des séquences sur la structure montre que les résidus conservés sont éparpillés dans toute la structure. Mais, les domaines conservés au cours de l'évolution se regroupent à l'intérieur de l'enzyme (figure 2) et encadrent le

site actif, suggérant une conservation des mécanismes catalytiques. La conservation entre la levure et l'homme est beaucoup plus forte, comme l'indique les hétérocomplémentations par des sous-unités humaines. L'alignement des séquences des sous-unités humaines dans la structure de l'ARN polymérase II de levure montre que les résidus conservés sont bien répartis dans toute la structure, ce qui indique que les deux enzymes ont vraisemblablement des structures tridimensionnelles très proches.

La structure cristallographique des ARN polymérases I et III n'est pas encore connue. L'enveloppe de la pol I, semblable à celle de la pol II, a été déterminée par microscopie électronique (Schultz *et al.*, 1993) et les sous-unités spécifiques ont pu y être localisées (Bischler *et al.*, 2002). Aucune donnée structurale n'est en revanche disponible pour la pol III. On peut néanmoins supposer que son organisation globale est similaire à celles des autres ARN polymérases mais l'emplacement des sous-unités spécifiques ne peut pas être prédit. Des cribles utilisant la technique du double-hybride ont été réalisés sur des sous-unités d'ARN polymérases et de facteurs de transcription et ont permis d'identifier des partenaires pour ces différentes protéines au sein des machineries transcriptionnelles (Flores *et al.*, 1999). Un modèle d'organisation de l'ARN polymérase III, présenté sur la figure 7, incluant les données de suppressions multicopies (Chiannilkulchai *et al.*, 1992a ; Chiannilkulchai *et al.*, 1992b ; Stettler *et al.*, 1993 ; Thuillier *et al.*, 1995) et de double-hybride dirigé (Lalo *et al.*, 1993 ; Werner *et al.*, 1993), a ainsi été proposé (Flores *et al.*, 1999).

I.3. Modèle séquentiel versus modèle holoenzyme.

In vitro, les ARN polymérases seules ne sont pas capables de reconnaître le promoteur et d'effectuer une transcription spécifique à partir de ce promoteur. L'addition de facteurs spécifiques est nécessaire. Chacune des ARN polymérases possède son propre jeu de facteurs généraux de transcription. Des études de reconstitution *in vitro* ont permis d'isoler, à partir de fractions d'extraits cellulaires,

les différents facteurs qui permettent d'obtenir une transcription spécifique à partir d'un promoteur. Ceci a amené à la proposition d'un assemblage séquentiel pour chacune des machineries de transcription.

Au cours des différentes étapes de la transcription, les complexes de transcription s'assemblent et subissent des modifications. Quand l'ARN polymérase quitte le promoteur, elle se détache de certains facteurs de transcription qui ne sont plus nécessaires au cours de l'élongation mais qui peuvent rester attachés au promoteur, facilitant ainsi une nouvelle initiation. D'autres facteurs de transcription, d'élongation et de remodelage entrent en jeu après l'initiation de la transcription afin d'augmenter la processivité de l'enzyme et de faciliter la terminaison.

Au modèle séquentiel s'oppose le modèle holoenzymatique. Ce modèle est né de la purification de plusieurs formes de l'ARN polymérase II associées à différents facteurs comme des facteurs de transcription ou de remodelage la chromatine (Kim *et al.*, 1994 ; Koleske and Young, 1994 ; Wilson *et al.*, 1996 ; Cho *et al.*, 1998 ; Neish *et al.*, 1998). Ces complexes ont été appelés holoenzymes. Dans le modèle holoenzymatique, tout ou partie de la machinerie de transcription est préassemblée dans un énorme complexe qui peut être recruté sur les promoteurs par des activateurs. Cependant, la composition de l'holoenzyme est encore sujette à débat. En effet, les différentes purifications font apparaître des complexes de compositions distinctes. Elles pourraient être dues aux méthodes biochimiques de purification employées. Ces différences de compositions pourraient également témoigner de l'existence de plusieurs types de complexes de compositions variables et/ou de plusieurs modes d'assemblage de la machinerie de transcription. L'holoenzyme n'est pas une spécificité de la pol II. Des complexes similaires contenant la pol I ou la pol III associées à des facteurs de transcription et des régulateurs ont également été purifiés (Saez-Vasquez and Pikaard, 1997 ; Wang *et al.*, 1997 ; Seither *et al.*, 1998).

Les modèles d'assemblage séquentiel et holoenzymatique ne sont pas mutuellement exclusifs et il est possible que les deux coexistent dans la cellule. Toutefois, aucune donnée à ce jour ne soutient l'existence d'un mode de recrutement holoenzymatique *in vivo*.

L'ADN des cellules eucaryotes est compacté dans le noyau grâce à une série d'enroulements et de repliements successifs. La structure formée par l'association de l'ADN avec des histones et une série d'autres protéines est appelée chromatine. Les protéines chromatinienne non-histones ne seront pas abordées dans cette introduction (pour revue voir Wolffe, 1998). Cette structure condensée de l'ADN peut constituer un obstacle pour des processus agissant sur l'ADN comme la transcription en limitant l'accessibilité de l'ADN. L'organisation de la chromatine en territoires et leurs répartitions dans l'espace nucléaire influencent également la transcription. Ces aspects sont l'objet du chapitre suivant. Des changements de la structure chromatinienne permettent de la rendre plus accessible à la machinerie de transcription. Ils mettent en jeu des complexes spécialisés qui modifient post-traductionnellement les histones ou altèrent la structure nucléosomale. Ces différentes activités seront abordées dans les chapitres III et IV de cette introduction.

II. Architecture nucléaire et transcription.

II.1. Condensation de l'ADN - structure de la chromatine.

L'ADN est enroulé sur environ 146 paires de bases (1,65 tour) autour d'octamères d'histones (Kornberg, 1974 ; Kornberg and Thomas, 1974). Le complexe ADN-octamère d'histones forme le cœur du nucléosome. L'enroulement de l'ADN est maintenu grâce à des interactions électrostatiques entre les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN et les charges positives des histones. Cette structure est dite en "collier de perles" ou en "chapelet". Une histone de liaison se fixe aux segments d'ADN (de 20 à 200 pb) séparant deux cœurs nucléosomaux. L'addition de cette histone permet une condensation en spirale qui donne naissance à une fibre de 30 nm de diamètre. Cette fibre subit alors une série de repliements successifs sur elle-même pour aboutir au chromosome métaphasique condensé (figure 8).

II.2. Structure du nucléosome.

II.2.1. Structure des histones.

Il existe 5 types principaux d'histones H2A, H2B, H3, H4 et H1. Ces protéines sont parmi les plus conservées au cours de l'évolution chez les eucaryotes. Les histones dites de "cœur" correspondent aux histones H2A, H2B, H3 et H4. Ce sont des protéines d'environ 14 kDa, organisées en deux domaines distincts : une queue N-terminale peu structurée et un domaine central et C-terminal qui adopte une structure particulière dite en "repliement histone" (ou "histone fold", terme que j'utiliserai dans ce manuscrit). La similitude entre les histones H2A, H2B, H3 et H4 en termes de séquence et de structure suggère qu'elles possèdent une origine commune. Leurs extrémités N-terminales sont fortement chargées positivement et riches en lysine pour les histones H2A et H2B ou en arginine pour les histones H3 et H4. Une étude cristallographique a permis d'obtenir la structure du motif histone fold, commun aux histones de type H2A, H2B, H3, et H4 (Arents *et al.*, 1991). Ce dernier est constitué d'une longue hélice α flanquée de deux hélices plus courtes reliées par des boucles formées de feuillet β . Ce repliement intervient dans les interactions entre histones au sein du nucléosome (Arents *et al.*, 1991). La figure 9 présente l'association des histones "cœurs" par leurs motifs histone fold. Cette structure n'est pas une spécificité des histones. Ce type de repliement a été retrouvé dans de nombreuses protéines impliquées dans des interactions protéine-protéine ou protéine-ADN (<http://genome.nhgri.nih.gov/histones/> ; Baxevanis and Landsman, 1997 et références incluses). Contrairement à sa structure tridimensionnelle, la séquence primaire d'un histone fold n'est pas toujours conservée.

L'histone de liaison H1 a une structure différente de celle des autres histones. Sa masse moléculaire est d'environ 21 kDa. Plusieurs variants de cette histone, ont été isolés dont certains sont spécifiques de certains types cellulaires ou de stades de développement. Chez *S. cerevisiae*, la seule histone de liaison caractérisée à ce jour est codée par le gène non essentiel *HHO1*. Les histones de liaison sont formées d'un domaine central globulaire flanqué de deux queues N et C-terminales basiques. Elles stabilisent la structure nucléosomale et favorisent la formation de structure d'ordre supérieur (Bednar *et al.*, 1998 ; Carruthers *et al.*, 1998). Le positionnement de l'histone de liaison par rapport aux cœurs nucléosomaux n'est pas bien établi. Il semble que plusieurs sites soient possibles (revue dans Travers, 1999). La dynamique des mouvements de l'histone H1 a été étudiée grâce à des fusions avec la GFP (protéine fluorescente verte). La liaison de l'histone H1 est labile et très dynamique. L'histone H1 ne reste liée que quelques minutes à un endroit donné. Le temps de résidence est diminué quand les histones "cœur" sont acétylées, ce qui suggère des taux d'échange plus élevés dans des conditions où la chromatine est remodelée (Misteli *et al.*, 2000). Elle est liée de façon plus stable dans l'hétérochromatine que dans l'euchromatine. D'autre part, la présence de l'histone H1 inhibe l'acétylation des histones cœur et le remodelage de la chromatine par le complexe SWI/SNF (Herrera *et al.*, 2000 ; Hill and Imbalzano, 2000 ; voir chapitres III et IV).

Chez la levure, on dénombre 10 gènes codant des histones (tableau II). Alors qu'il n'y a qu'un seul gène pour l'histone H1, il existe deux gènes codant des protéines pratiquement identiques pour chacune des histones "cœur". Les deux couples d'histones H2A/H2B et H3/H4 sont codés par des gènes transcrits de manière divergente à partir d'un même promoteur. Chez les eucaryotes supérieurs, il existe de très nombreux variants d'histones dont certains sont spécifiques de types cellulaires et parfois présents seulement à certaines étapes du développement.

Plusieurs variants de l'histone H2A existent chez les eucaryotes supérieurs. L'un d'entre eux, H2AZ, est conservé de la levure à l'homme et semble impliqué dans la régulation transcriptionnelle. Sa répartition dans le génome n'est pas uniforme et il n'est pas uniquement localisé au niveau de la chromatine transcriptionnellement active (Leach *et al.*, 2000). Chez la souris, l'inactivation du gène *H2AZ* est létale dès le début du développement embryonnaire (Faast *et al.*, 2001). En revanche, son homologue de levure, codé par le gène *HTZ1/HTA3*, n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire. La délétion de ce gène provoque un phénotype thermosensible et entraîne une dépendance accrue vis-à-vis de complexes histone acétyltransférases comme le complexe SAGA ou de facteurs de remodelage de la chromatine comme SWI/SNF (voir chapitre III et IV ; Santisteban *et al.*, 2000). Les nucléosomes incorporant des variants H2AZ semblent moins stables ce qui suggère que l'histone H2AZ pourrait déstabiliser la chromatine et permettre une meilleure accessibilité de l'ADN (Abbott *et al.*, 2001). Cependant, l'histone H2AZ n'intervient pas uniquement dans l'activation transcriptionnelle. Elle est également détectée au niveau des loci soumis à une extinction transcriptionnelle (silencing) et est requise pour que cette extinction s'y effectue normalement (Dhillon and Kamakaka, 2000). Récemment, Fan et collaborateurs (Fan *et al.*, 2002) ont proposé que H2AZ exerce un rôle fondamental en régulant l'équilibre entre différentes formes conformationnelles de la chromatine et en créant des domaines en état de "pause" du point de vue transcriptionnel.

II.2.2. Structure cristallographique du nucléosome.

Des études cristallographiques ont montré que le nucléosome a une structure tripartite, constituée d'un tétramère central (H3/H4)₂ flanqué par deux dimères H2A/H2B (Burlingame *et al.*, 1985 ; Arents *et al.*, 1991). La structure cristallographique d'un nucléosome de xénope à une résolution de 2,8 Å est présentée à la figure 10 A (Luger *et al.*, 1997). L'ADN s'enroule autour des cœurs nucléosomaux à raison de 1,65 supertour par nucléosome. Les différentes histones

s'assemblent par paires via leurs motifs histone fold. Ces motifs participent également aux interactions entre hétérodimères et avec l'ADN. Les queues N-terminales des histones sont peu structurées et sortent du nucléosome. Celles des histones H3 et H2B s'intercalent entre les boucles d'ADN qui s'enroulent autour du nucléosome. Une partie de la queue amino-terminale de l'histone H2A interagit avec l'ADN à l'extérieur de l'hélice au niveau d'un sillon mineur. Par ailleurs, plusieurs résidus basiques des queues d'histones H4 interagissent avec une région très acide de l'hétérodimère H2A/H2B. Ils pourraient donc être impliqués dans les interactions entre nucléosomes adjacents et ainsi favoriser l'assemblage de structures d'ordre supérieur ou le repliement de la fibre de chromatine. La structure d'un nucléosome de levure a aussi été résolue (White *et al.*, 2001). Elle est globalement conservée par rapport à celle d'un nucléosome de xénope (figure 10 B). Toutefois, des divergences dans les séquences des histones de *S. cerevisiae* semblent provoquer une légère déstabilisation de la structure du nucléosome. Les queues N-terminales pourraient également être agencées différemment. Enfin, des différences dans les interactions entre nucléosomes ont été observées au sein des cristaux, ce qui pourrait refléter des différences d'agencement *in vivo*.

Les cœurs nucléosomaux engagent de nombreuses interactions avec le squelette de l'ADN. L'orientation des sillons majeurs et mineurs par rapport à la surface des nucléosomes est un point critique de l'accessibilité de l'ADN. En effet, le site de fixation d'une protéine peut être inaccessible s'il est tourné vers l'intérieur du nucléosome. Par exemple, la TATA Binding Protein (TBP) se fixe sur la boîte TATA dans le sillon mineur de l'ADN. Si le sillon mineur de la boîte TATA est orienté vers la surface du nucléosome, la capacité de la TBP à se fixer à la boîte TATA est diminuée (Imbalzano *et al.*, 1994). Les nucléosomes et leurs positionnements sur la séquence régulent donc l'accessibilité de l'ADN aux protéines qui s'y fixent.

La structure cristallographique d'un nucléosome contenant le variant H2AZ a été résolue (Suto *et al.*, 2000). Elle est proche de celle du nucléosome standard (contenant H2A), mais quelques différences sont visibles. La surface d'interaction H2AZ/H2B est modifiée par rapport à celle de H2A/H2B de telle sorte que l'intégration d'une deuxième histone H2AZ est favorisée. Enfin, l'interface avec le dimère H3/H4 adopte une conformation légèrement différente.

II.3. Architecture nucléaire et transcription.

Le noyau des cellules eucaryotes a une organisation fonctionnelle remarquable. Sa structure est hétérogène et extrêmement dynamique. Les techniques de microscopie et de fluorescence ont permis de mettre en évidence la présence au cœur du noyau de plusieurs sous-structures, appelées corps nucléaires. Contrairement aux organites intracellulaires, les corps nucléaires ne sont pas physiquement délimités par des membranes, mais constituent pourtant des domaines bien individualisés. La majeure partie est impliquée dans la transcription et la maturation des ARN. La compartimentation et la dynamique nucléaire sont par conséquent des paramètres fondamentaux dans la régulation de l'expression génique (pour revue, voir Dundr and Misteli, 2001).

II.3.1. Le nucléole.

Le nucléole est le compartiment nucléaire le plus anciennement connu. C'est le site de transcription des ARN ribosomiques et d'assemblage des ribosomes. Chez *S. cerevisiae*, il n'y a qu'un seul nucléole, falciforme, et généralement accolé à la membrane nucléaire. Chez cet organisme, le nucléole persiste tout au long du cycle cellulaire. En revanche, chez les mammifères, il y a généralement 2 à 3 nucléoles (le nombre variant selon le type cellulaire) qui disparaissent au cours de la mitose.

Le nucléole s'organise autour des gènes d'ADN ribosomique (ADNr). Chez la levure, l'ADNr est constitué de 100 à 200 répétitions (selon les souches) d'une unité élémentaire contenant les séquences codant le précurseur 35S des ARN 18S, 25S et 5.8S, transcrit par la pol I, et l'ARN 5S, transcrit par la pol III dans l'orientation inverse du 35S (figure 11). Toutes les copies d'ADNr sont regroupées en un locus, *RDN1*, porté par le chromosome XII. Cette association 35S/5S n'est retrouvée que chez *S. cerevisiae* (Philippsen *et al.*, 1978). Par contre, chez les mammifères, l'ADNr est réparti en plusieurs "clusters" sur différents chromosomes. La partie du chromosome qui porte l'ADNr est enfouie dans le nucléole. Tous les gènes d'ADNr ne sont pas transcriptionnellement actifs simultanément. La structure de la chromatine de l'ADN ribosomique a été étudiée par la méthode du pontage au psoralène (Conconi *et al.*, 1992 ; Lucchini and Sogo, 1992 ; Dammann *et al.*, 1993). L'efficacité du pontage dépend de l'accessibilité de l'ADN et donc de sa structure nucléosomale. L'application de cette technique à l'ADNr de *S. cerevisiae* a permis de montrer la coexistence de deux populations d'ADNr en quantités équivalentes (soit environ 50 à 100 copies). La première, accessible au psoralène, est associée à l'ARN 35S et correspond à des copies actives dépourvues de nucléosomes. Toutes les copies actives ne sont pas regroupées mais sont réparties dans l'ensemble du "cluster". La seconde classe n'est pas accessible au psoralène et n'est pas active transcriptionnellement (Dammann *et al.*, 1993).

La structure du nucléole a été originellement décrite dans des cellules humaines. L'observation de nucléoles en microscopie électronique a permis l'identification de trois zones concentriques : le composant fibrillaire central (CF), le composant fibrillaire dense (CFD) et le composant granulaire (CG). Des études récentes ont montré que le nucléole de *S. cerevisiae* est formé des trois zones CF, CFD et CG (Léger-Silvestre *et al.*, 1999). Cependant, la zone CF n'est pas présente chez tous les organismes (revue dans Olson *et al.*, 2000). Les zones nucléolaires correspondent aux différentes étapes de la synthèse et maturation des ARN ribosomiques et d'assemblage des ribosomes. Des expériences d'hybridation *in situ* et d'incorporation

de Br-UTP ont montré que l'ARN 35S est localisé à la périphérie de la zone médullaire CF (Dundr and Raska, 1993 ; Dadoune *et al.*, 1994 ; Hozak *et al.*, 1994 ; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1997 ; Cmarko *et al.*, 1999). Les différents gènes d'ADNr seraient regroupés au sein du composant granulaire et les copies transcriptionnellement actives placées à l'interface CF/CFD. La maturation de l'ARN 35S, partiellement co-transcriptionnelle, débute dans la zone fibrillaire dense et s'achève dans le composant granulaire. Elle consiste principalement en des modifications de bases de l'ARN et une série de clivage.

Le déterminisme de la formation du nucléole est encore mal connu. L'intégrité du nucléole est dépendante de la persistance des transcriptions pol I et pol II comme l'indiquent les expériences d'inhibitions sélectives de ces transcriptions (voir (Olson *et al.*, 2000) et références incluses). Cependant, des travaux réalisés chez *S. cerevisiae* montrent que ni la transcription par l'ARN polymérase I, l'organisation en tandem, la localisation chromosomique de l'ADNr ou la présence d'un nucléole "standard" ne sont absolument requises pour la synthèse et la maturation d'ADNr et la biogénèse des ribosomes. (Nierras *et al.*, 1997 ; Oakes *et al.*, 1998). La construction de souches dans lesquelles la transcription pol I est inactivée ou bien dans lesquelles les copies d'ADNr sont toutes délétées (que j'appellerai Δ ADNr) a permis d'analyser l'effet des différents acteurs. Les souches Δ ADNr peuvent être complétées par un plasmide multicopies portant un gène d'ADNr transcrit par la pol I. Dans ces souches, on n'observe pas de nucléole classique, mais de multiples "mini-nucléoles". Curieusement, lorsque l'ADNr n'est plus transcrit par la pol I, mais synthétisé par la pol II à partir d'un promoteur *GAL*, ces "mini-nucléoles" s'agrègent et forment une structure compacte. Ces expériences indiquent en revanche que l'organisation du nucléole et son maintien dépendent à la fois de la transcription par la pol I, de l'organisation et de la localisation des gènes d'ADNr.

En dehors de ces fonctions dans la biogénèse des ribosomes, il apparaît clairement que le nucléole est un point de convergence de plusieurs voies métaboliques. Il est notamment impliqué dans la maturation de certains ARN de transfert et sert de plate-forme d'assemblage pour des particules ribonucléiques. Le nucléole est également une zone de séquestration de certains facteurs de transcription. L'activité de ces facteurs est régulée par leur présence dans ou hors du nucléole. Ce processus intervient notamment dans la régulation du cycle cellulaire (revue dans Carmo-Fonseca *et al.*, 2000).

II.3.2. Les territoires chromosomiques.

Les études sur les territoires chromosomiques ont été essentiellement menées chez les eucaryotes supérieurs. L'évolution des techniques de FISH (Fluorescence *in situ* hybridisation) a permis de localiser les chromosomes au sein du noyau cellulaire (pour revue, Cremer and Cremer, 2001). Des études réalisées sur des cellules de mammifères grâce à cette technique ont mis en évidence l'existence de territoires chromosomiques. La figure 12 A montre l'exemple d'une peinture chromosomique sur un fibroblaste de poulet. L'observation dans le temps de ces territoires suggère qu'ils sont plus ou moins mobiles, selon les organismes et les types cellulaires étudiés. (Borden and Manuelidis, 1988 ; De Boni, 1994 ; Csink and Henikoff, 1998 ; Bornfleth *et al.*, 1999). La reproductibilité des positions des territoires dans les différents types cellulaires est sujette à débat (Nagele *et al.*, 1995 ; Allison and Nestor, 1999 ; Cremer and Cremer, 2001).

Une corrélation entre la taille des chromosomes humains et leurs positions par rapport au centre du noyau a été établie dans des fibroblastes humains. Les chromosomes de petite taille ont tendance à se localiser à l'intérieur du noyau tandis que les chromosomes de plus grande taille sont "rejetés" vers la périphérie (Sun *et al.*, 2000). La taille n'est pas le seul déterminant de la position d'un chromosome. La densité génique entre aussi en ligne de compte. Ceci a été démontré dans le cas des chromosomes XVIII et XIX humains (figures 12 B et 12 C). Ces deux chromosomes ont des tailles équivalentes mais portent un nombre de gènes différents. Le chromosome XVIII qui a une densité génique faible, a été localisé à la périphérie nucléaire tandis que le chromosome XIX, riche en gènes, est localisé au centre du noyau (Croft *et al.*, 1999 ; Boyle *et al.*, 2001). La localisation d'un chromosome dans l'espace nucléaire peut donc parfois être corrélée au niveau de transcription sur ce chromosome. Ceci est cohérent avec le fait le chromosome X inactif des femelles mammifères est toujours localisé à la périphérie nucléaire (revue dans Boumil and Lee, 2001).

La localisation d'un gène au sein d'un territoire chromosomique est également un point important de sa régulation transcriptionnelle. Les gènes inactifs sont plus fréquemment localisés à l'intérieur du territoire. Cette relation n'est toutefois pas absolue. En effet, à la surface de ces territoires, on trouve à la fois des gènes actifs et inactifs. De plus, des sites actifs de transcription sont aussi observés au cœur des territoires chromosomiques, ce qui indique qu'ils sont "perméables" aux machineries de transcription. La répartition euchromatine/hétérochromatine influence localement le statut transcriptionnel des gènes (Dundr and Misteli, 2001). Des études ont mis en évidence des relocalisations spatiales en fonction de l'évolution de la transcription. À titre d'exemple, dans des lymphocytes B de souris en cours de différenciation, certains gènes sont relocalisés près de l'hétérochromatine centromérique, ce qui a pour effet d'éteindre leur transcription (Brown *et al.*, 1997). Cependant, bien que des "repositionnements" hors des zones hétérochromatiques

soient observés, ils ne sont pas suffisants pour permettre l'activation transcriptionnelle.

Un modèle d'organisation nucléaire selon lequel les chromosomes occupent des territoires définis, séparés par des régions interchromatiniennes, a été proposé. Les gènes transcriptionnellement actifs seraient préférentiellement localisés à la surface de ces territoires ou dans des canaux accessibles aux machineries transcriptionnelles. Les zones interchromosomiques sont, dans ce modèle, des espaces réduits qui pourraient servir de zones de maturation et de zones d'assemblage pour les différentes machineries (Cremer and Cremer, 2001).

Chez la levure, peu de travaux sur la localisation des chromosomes ont été menés en raison de la taille réduite de la cellule. Il ne semble pas exister de territoires chromosomiques tels qu'ils ont été décrits chez les eucaryotes supérieurs. Haber et Leung ont réalisé des travaux sur la mobilité des chromosomes dans le noyau suite à des cassures double brins. Ils ont pu montrer qu'après la survenue de cassures, l'apparition de translocations de bras chromosomiques est aussi fréquente que la réparation interchromosomique. Cela suggère que, chez la levure, les chromosomes mitotiques ne sont pas confinés dans des domaines précis et sont libres de se déplacer dans le noyau (Haber and Leung, 1996). Des données récentes sur la dynamique des chromosomes interphasiques de la levure montrent que les chromosomes ont un comportement très dynamique et bougent beaucoup dans le nucléoplasme à l'exception des télomères qui sont nettement moins mobiles (Heun *et al.*, 2001). Aucune donnée ne soutient actuellement l'existence de territoires chromosomiques délimités chez la levure.

II.4. Les nucléosomes, un frein pour la transcription ?

In vivo, lors de la transcription, les nucléosomes restent attachés à l'ADN. Des études par microscopie électronique montrent que la synthèse d'ARN s'effectue

majoritairement sur de l'ADN condensé. *In vitro*, une transcription peut être reconstituée sur une matrice nucléosomale mais avec une moindre efficacité que sur un ADN nu (pour revue voir Widom, 1997). La présence de nucléosomes sur l'ADN peut constituer un obstacle pour la transcription en entravant la fixation d'activateurs ou de facteurs de transcription, le démarrage et l'élongation de la transcription. Cependant, la réalisation d'une transcription efficace sur une matrice nucléosomale indique que celle-ci doit être considérée comme une structure dynamique susceptible d'être remaniée et de se réarranger localement. L'équilibre entre condensation et accessibilité de l'ADN et la capacité d'une cellule à le réguler constitue donc un niveau crucial du contrôle de l'expression des gènes.

II.4.1. Répression de la transcription par les nucléosomes.

Les nucléosomes n'inhibent pas totalement le fonctionnement des ARN polymérases. Plusieurs études *in vitro* sur des ARN polymérases phagiques ou eucaryotes ont montré que ces enzymes sont capables de transcrire *in vitro* une matrice contenant des nucléosomes bien que moins efficacement qu'une matrice nue (Studitsky *et al.*, 1997). Durant l'élongation par les ARN polymérases phagiques ou l'ARN polymérase III eucaryote, l'intégralité du nucléosome est déplacée vers l'aval du complexe de transcription grâce à la formation d'une boucle d'ADN. Dans le cas de la pol II, la situation semble être différente. Une étude récente du laboratoire de V. Studitsky montre qu'en dessous ou aux concentrations ioniques physiologiques, un nucléosome constitue une barrière très forte pour la progression de la pol II. L'augmentation de la force ionique permet le passage de l'ARN polymérase, mais la transcription s'accompagne de la dissociation d'un dimère H2A/H2B. Cette dissociation n'a pas été observée à ce jour avec les ARN polymérases de phages ou la pol III eucaryotes (Kireeva *et al.*, 2002 et références incluses). Une dissociation du dimère H2A/H2B a été également constatée *in vivo* et corrélée à une transcription active. Ces auteurs ont proposé qu'*in vivo*, le passage de la pol II provoque la

dissociation de ce dimère et que l'élongation puisse être facilitée par des facteurs de remodelage.

L'assemblage *in vitro* d'une matrice d'ADN en matrice nucléosomale peut inhiber la transcription de ce fragment par masquage des éléments promoteurs et par compaction de la matrice (Izban and Luse, 1991 ; Hansen and Wolffe, 1992 ; Hayes and Wolffe, 1992). Comme cela a été mentionné précédemment, la TBP appartient à une catégorie de facteurs qui ne peuvent pas se fixer à leur site sur le promoteur si ce site est masqué par la présence d'un nucléosome. (Imbalzano *et al.*, 1994). Cette barrière peut être levée par des facteurs de remodelage de la chromatine (Lorch *et al.*, 1992 ; Imbalzano *et al.*, 1994). La chromatine n'est toutefois pas un obstacle systématique pour la liaison de protéines à l'ADN. Certains facteurs, comme l'activateur transcriptionnel de levure Gal4 ou le récepteur humain aux glucocorticoïdes, sont capables de se fixer sur leur site même si celui-ci est masqué par un nucléosome (Perlmann and Wrangé, 1988 ; Workman and Kingston, 1992).

In vivo, chez *S. cerevisiae*, la déplétion de l'histone H4 entraîne l'activation de la transcription certains gènes (Han and Grunstein, 1988 ; Han *et al.*, 1988). L'effet répressif de l'histone H1 est moins net. Les gènes transcriptionnellement actifs sont dépourvus d'histone H1, mais conservent une structure nucléosomale (Dedon *et al.*, 1991 ; Bresnick *et al.*, 1992). Selon les études, l'addition *in vitro* de cette histone sur des matrices nucléosomales peut affecter ou non la transcription (O'Neill *et al.*, 1995 ; Howe *et al.*, 1998). La délétion du gène codant l'histone H1 a également des effets variables selon les organismes. Chez *S. cerevisiae*, la délétion du gène *HHO1* n'a pas d'effet phénotypique marqué (Escher and Schaffner, 1997 ; Ushinsky *et al.*, 1997 ; Patterson *et al.*, 1998) et la transcription d'un nombre restreint de gènes est diminuée dans le mutant (Hellauer *et al.*, 2001). De même, chez *Tétrahymena thermophila*, seul un petit groupe de gènes est affecté (Shen and Gorovsky, 1996). Par contre, chez les eucaryotes supérieurs, chez lesquels il existe plusieurs gènes codant des histones de

liaison, la délétion de l'histone H1 ne semble pas avoir d'effet. La compensation par d'autres histones de liaison pourrait expliquer cette absence de phénotype (Sirotkin *et al.*, 1995 ; Lin *et al.*, 2000 ; Rabini *et al.*, 2000 ; Fan *et al.*, 2001).

II.4.2. Structure chromatinienne et activation de l'expression.

Le positionnement de nucléosomes sur l'ADN peut parfois permettre d'activer la transcription en rapprochant physiquement des éléments promoteurs. Cela a été montré par exemple chez le xénope dans le cas du gène de la vitellogénine B1. Le positionnement d'un nucléosome en amont du promoteur permet d'augmenter le taux de transcription de ce gène (Corthesy *et al.*, 1990). En amont de la séquence codante, se trouvent trois séquences correspondant respectivement au site de fixation du récepteur de l'œstrogène et des facteurs de transcription HNF3, NF1 et TFIID. Le positionnement d'un nucléosome entre la boîte TATA et le site de liaison du facteur NF1 permet *in vitro* d'augmenter le taux de transcription d'un facteur dix. Ceci suggère que la présence de ce nucléosome permet de rapprocher spatialement des éléments distants sur la séquence primaire et ainsi de favoriser des interactions entre facteurs de transcription (Schild *et al.*, 1993).

La présence de nucléosomes sur l'ADN a des répercussions sur les mécanismes transcriptionnels. La condensation de l'ADN est donc un moyen de régulation de l'expression des gènes. La transcription d'un gène peut nécessiter un réarrangement de la structure chromatinienne afin de dégager les séquences promotrices ou de faciliter la progression des enzymes. La machinerie de transcription est adaptée au contexte chromatinien. Elles font appel soit à des propriétés intrinsèques soit à des autres facteurs avec lesquels elles coopèrent. Ces différentes activités seront détaillées dans les chapitres III et IV de cette introduction.

Notons que le remodelage de la chromatine n'est pas une nécessité spécifique à la transcription par l'ARN polymérase II. Des activités de remodelage ont été

associées aux trois ARN polymérases (Wilson *et al.*, 1996 ; Albert *et al.*, 1999 ; Hsieh *et al.*, 1999 ; Kundu *et al.*, 1999). La transcription par la pol I nécessite aussi l'intervention de ce type de facteurs. Les copies actives d'ADNr sont dépourvues de nucléosomes (voir II.3.1). Quel que soit leur statut transcriptionnel, toutes les copies d'ADNr sont recouvertes de nucléosomes après l'étape de réplication de l'ADN (Lucchini and Sogo, 1995). La transcription s'accompagne du retrait des nucléosomes qui recouvrent les unités actives. L'établissement d'une structure dépourvue de nucléosome requiert le passage d'ARN polymérases, ce qui suggère qu'un facteur intervient avant ou concomitamment au passage de la première ARN polymérase (Dammann *et al.*, 1995). Ce facteur n'a pas encore été isolé.

La chromatine influence également la transcription par l'ARN polymérase III. La compaction par des nucléosomes de matrice de l'ARN 5S réduit sa transcription. Des études *in vitro* sur des extraits d'œufs de xénope montrent que l'assemblage de nucléosomes sur le gène de l'ARN 5S inhibe sa transcription (Almouzni *et al.*, 1990). Il y a une compétition entre l'assemblage de la chromatine et la fixation des facteurs de transcription. Le préassemblage de ces facteurs sur la matrice la rend réfractaire à l'inhibition par les nucléosomes (Almouzni *et al.*, 1990 ; Tremethick *et al.*, 1990).

In vitro, une transcription efficace du gène *SNR6* peut être obtenue en l'absence du facteur TFIIC. La transcription de ce gène est diminuée lorsque la matrice est préalablement assemblée en nucléosome. Dans ces conditions, l'addition du facteur TFIIC restaure la transcription de cette matrice *SNR6*. Par contre, la destruction de la boîte B du promoteur supprime l'effet activateur du facteur TFIIC (Burnol *et al.*, 1993). La déplétion de l'histone H4 ou des mutations dans l'histone H3 ont pour conséquences d'augmenter la transcription de ce gène muté. La transcription du gène sauvage n'est pas affectée (Marsolier *et al.*, 1995). Ceci indique toutefois que les facteurs de transcription pol III sont capables de se fixer efficacement sur une matrice chromatinienne. L'acétylation des histones facilite la fixation des facteurs généraux et augmente la transcription par l'ARN polymérase III (Lee *et al.*, 1993 ; Tse *et al.*, 1998). Le facteur TFIIC humain est capable *in vitro* de lever la répression de la transcription

des ARNt par la chromatine (Kundu *et al.*, 1999). Les mécanismes moléculaires de l'action activatrice de ce facteur ne sont pas encore connus. Le facteur TFIIC humain possède une activité histone acétyltransférase sur des histones libres ou assemblées en nucléosomes (Hsieh *et al.*, 1999 ; Kundu *et al.*, 1999). L'inhibition de cette activité est corrélée à une diminution de l'activité transcriptionnelle (Kundu *et al.*, 1999). Le facteur TFIIC du bombyx du mûrier a été purifié. Une activité histone acétyltransférase est associée à ce facteur jusqu'à l'étape de purification par affinité pour l'ADN. L'addition de cette activité permet de lever partiellement la répression de la transcription d'une matrice nucléosomale (Srinivasan and Gopinathan, 2002). Cette capacité à acétyler les histones pourrait expliquer l'action positive du facteur TFIIC sur la transcription par la pol III. Toutefois, le facteur *S. cerevisiae* ne semble pas posséder d'activité similaire. Une possibilité serait qu'il agisse en coopération avec un complexe histone acétyltransférase. Mais ce facteur n'est pas copurifié avec le facteur TFIIC de levure. Une autre possibilité serait que TFIIC possède une autre propriété intrinsèque qui permette de déplacer les nucléosomes.

II.5. Chromatine et transcription, une évolution parallèle.

Les composants de la chromatine et de la machinerie de transcription ont évolué parallèlement pour remplir leurs fonctions dans les cellules eucaryotes. Il est particulièrement intéressant de noter la présence de mêmes motifs structuraux voire de mêmes protéines au sein de la chromatine ou de la machinerie de transcription. Le motif histone fold, impliqué dans l'assemblage du nucléosome, est retrouvé dans de nombreuses protéines parmi lesquelles plusieurs TAF_{II} (TBP Associated Factor) et des facteurs de transcription. Au sein du facteur général de transcription TFIID, 9 des 14 TAF_{II} contiennent un domaine histone fold. Les histones H3, H4 et H2B ont des similitudes respectivement avec les protéines yTAF_{II}60/hTAF_{II}80, yTAF_{II}17/hTAF_{II}31 et yTAF_{II}61/hTAF_{II}20. Ces 9 protéines forment 5 paires différentes. La structure TFIID, étudiée par microscopie électronique, révèle que ce

complexe s'organise autour d'une structure de type nucléosomale. Le cœur du complexe n'a toutefois pas la même structure que celle d'un véritable nucléosome. Les interactions potentielles avec l'ADN sont également différentes (revue dans Gangloff *et al.*, 2001). La présence de protéines TAF_{II} dans les complexes de la famille SAGA (voir III.2.1.) soulève la question de savoir s'il existe également dans ce complexe des structures de type histone. Ce repliement caractéristique est également présent dans les complexes de remodelage de la chromatine. Par exemple, deux sous-unités du complexe CHRAC présentent un tel motif (Poot *et al.*, 2000).

La ressemblance entre certaines protéines de la chromatine et de l'appareil transcriptionnel n'est pas une spécificité de système pol II. En effet, le facteur de transcription pol I UAF possède parmi ses sous-unités les histones H3 et H4. Les histones H2A et H2B ne sont pas détectées dans le complexe (Keener *et al.*, 1997).

La présence de structure de type nucléosomale ou d'histone dans un complexe intervenant sur l'ADN a généralement été interprétée comme une surface potentielle d'interaction avec l'ADN imitant une structure nucléosomale autour de laquelle l'ADN pourrait s'enrouler. Cela pourrait par conséquent offrir la possibilité de maintenir une structure "semi-condensée" mais compétente pour la transcription.

Il est également intéressant de remarquer que certains facteurs de transcription pol II et pol III possèdent des activités intrinsèques susceptibles d'influencer la structure de la chromatine (voir chapitre III). À titre d'exemple, le facteur TFIID contient une sous-unité TAF_{II}135/hTAF_{II}250/dTAF_{II}250 qui porte une activité histone acétyltransférase, de conjugaison à l'ubiquitine et dans les cas des protéines humaine et de drosophile, une activité kinase (Dikstein *et al.*, 1996 ; Pham and Sauer, 2000 ; Solow *et al.*, 2001 ; Wassarman and Sauer, 2001). Le complexe médiateur contient la protéine Nut1 qui possède également une activité histone acétyltransférase (Lorch *et al.*, 2000)).

La présence et le positionnement des nucléosomes a donc une influence sur la capacité des ARN polymérases à transcrire une matrice chromatinienne. Des changements locaux et transitoires de la structure chromatinienne surviennent au moment de la transcription et permettent de lever la barrière engendrée par la présence de nucléosomes. Ils permettent notamment de libérer les séquences promotrices. Il existe deux grandes catégories de remodelage. La première catégorie regroupe les modifications covalentes des histones. La plus étudiée de ces modifications est l'acétylation. Elle est généralement associée à l'activation transcriptionnelle. La seconde classe de remodelage fait intervenir des complexes enzymatiques spécialisés qui modifient la structure des nucléosomes ou leurs positionnements. Ces mécanismes de modification-remodelage revêtent une importance cruciale dans le bon déroulement des processus développementaux, de différenciation, de division cellulaire, de la réparation des dommages à l'ADN, du contrôle de la transcription... De nombreuses maladies humaines et notamment des cancers, sont dues à des dysfonctionnements de ces complexes de modification et de remodelage de la chromatine. Ces derniers sont des cibles thérapeutiques potentielles (pour revue, voir Redner *et al.*, 1999 ; Cairns, 2001 ; Marks *et al.*, 2001 ; Wolffe, 2001).

III. Transcription et modifications covalentes des histones.

Les histones font l'objet de nombreuses modifications covalentes post-traductionnelles. Ces modifications consistent en des acétylations, méthylations, phosphorylations et ubiquitinations. La figure 13 résume l'ensemble des modifications covalentes existant chez les eucaryotes supérieurs (revue dans Marks *et al.*, 2001). Ces différentes modifications post-transcriptionnelles des histones ont été corrélées avec le statut transcriptionnel d'un gène. Les queues N-terminales des histones ont des interactions fortes avec l'ADN et sont le principal siège de ce type de modifications. L'intervention des extrémités amino-terminales des histones H3 et H4

dans les interactions entre nucléosomes laisse supposer que certaines modifications covalentes participent à la déstabilisation de structure d'ordre supérieur.

III.1. Code des histones.

L'acétylation des queues N-terminales des histones est considérée comme un mécanisme de l'activation transcriptionnelle. Cependant, il existe un niveau basal d'acétylation des histones. L'acétylation ciblée de certains résidus se fait dans un contexte global d'acétylation et de déacétylation (Vogelauer *et al.*, 2000). La modification d'une lysine n'est pas systématiquement synonyme d'activation de la transcription. Par exemple, la lysine 14 de l'histone H4 est acétylée dans l'hétérochromatine (Braunstein *et al.*, 1996). Réciproquement, la déacétylation d'un résidu ne provoque pas toujours la répression des gènes concernés. Ceci suggère donc que le profil d'acétylation est déterminant et que l'effet transcriptionnel de l'acétylation des histones fait sans doute intervenir une combinaison de modifications et non seulement un effet de charge. De même, les autres modifications covalentes des histones entraînent, selon le contexte, des réponses différentes. L'association des différentes modifications formerait alors un code déchiffré par d'autres protéines, et déterminerait la voie dans laquelle s'engage la cellule. Cette hypothèse est contenue dans la théorie du code des histones proposée par D. Allis (Strahl and Allis, 2000 ; Jenuwein and Allis, 2001). Elle est soutenue par le fait qu'il existe des coopérations et/ou interférences entre les différentes modifications et le remodelage de la chromatine (Cosma *et al.*, 1999 ; Krebs *et al.*, 1999 ; Agalioti *et al.*, 2000 ; Rea *et al.*, 2000 ; Syntichaki *et al.*, 2000 ; Nakayama *et al.*, 2001 ; voir IV.5.)

Une des implications du code des histones est que les différentes modifications servent de balises pour le recrutement d'autres complexes. La découverte de motifs tels que les bromodomaines et chromodomaines, qui reconnaissent respectivement les histones acétylées et méthylées, conforte cette hypothèse. Le bromodomaine est un motif protéique d'environ 110 acides aminés, conservé chez les eucaryotes. On le retrouve fréquemment dans des protéines ayant un rapport avec la régulation de l'activité transcriptionnelle et notamment dans des protéines appartenant à des complexes histone acétyltransférases ou de remodelage de la chromatine comme par exemple Gcn5, Sth1 ou Rsc4 (voir III.2. et IV.2.). Le bromodomaine de l'histone

acétyltransférase Gcn5 est capable *in vitro* de se lier à la partie N-terminale de l'histone H4 (Dhalluin *et al.*, 1999b ; Ornaghi *et al.*, 1999). La présence de ce domaine dans des complexes de type HAT a soulevé la question de savoir si les bromodomaines pouvaient reconnaître spécifiquement les peptides acétylés. Ceci a été montré par des études par résonance magnétique nucléaire sur le bromodomaine de la protéine humaine Pcaf (Dhalluin *et al.*, 1999a, b).

Le chromodomaine (**CHR**omatin **OR**ganisation **MO**difier) est un motif est constitué d'une cinquantaine de résidus. Décrit pour la première fois chez la drosophile dans les protéines Polycomb et Hp1, ce module a par la suite été identifié dans toute une série de protéines différentes comme des histone méthyltransférases, des histone acétyltransférases, des intégrases, des hélicases. Sa structure a été résolue (Ball *et al.*, 1997) et son repliement est semblable à celui trouvé dans plusieurs protéines procaryotes et eucaryotes se fixant à l'ADN (revue dans Eissenberg, 2001). Le chromodomaine est capable de se fixer aux histones méthylées. Par exemple, le chromodomaine de la protéine Hp1 est capable de se lier à la queue amino-terminale de l'histone H3 méthylée en position 9 (Bannister *et al.*, 2001 ; Lachner *et al.*, 2001). La fonction exacte des chromodomaines n'est pas connue mais un rôle proposé est celui de module qui permettrait de cibler certaines zones chromosomiques ou des acides nucléiques (Eissenberg, 2001).

Les différentes modifications des histones pourraient donc constituer un signal de ciblage et d'ancrage d'activité de remodelage vers certaines régions chromatinienne.

III.2. L'acétylation des histones, un mécanisme lié à la transcription.

La réaction d'acétylation est un transfert d'un groupement acétyl depuis l'acétylcoenzyme A sur un résidu lysine de la protéine cible. Dans le cas des histones, elle est catalysée par les histone acétyltransférases. La réaction est réversible (catalysée alors par des histone déacétylases). Cette réaction a lieu sur les queues

amino-terminales des histones. L'acétylation des lysines diminue les charges positives de ces extrémités N-terminales. Elle pourrait de ce fait affaiblir les interactions entre les queues des histones et l'ADN ou entre nucléosomes (Luger *et al.*, 1997). Cette modification des histones provoque une sensibilité accrue des nucléosomes à la digestion par des nucléases, ce qui indique que l'ADN est plus accessible.

La corrélation entre la présence d'histones acétylées et la chromatine transcriptionnellement active a été établie dans les années 1960 (Pogo *et al.*, 1967 ; Allfrey *et al.*, 1968). Des anticorps dirigés contre les histones hyperacétylées reconnaissent des fragments de chromatine contenant beaucoup de gènes transcriptionnellement actifs (Reeves, 1984). Le lien entre acétylation des histones et transcription a ensuite été renforcé par la découverte de complexes co-activateurs possédant une activité histone acétyltransférase (HAT ; revue dans Roth *et al.*, 2001). Récemment, la forme de l'ARN polymérase II en élongation a été purifiée associée avec un complexe HAT, l'élongateur (Otero *et al.*, 1999). Le rôle de ce complexe au cours d'élongation est cependant controversé (Pokholok *et al.*, 2002).

III.2.1. Les histone acétyltransférases (HAT).

Les histone acétyltransférases ont pour substrats privilégiés les histones H3 et H4. Les autres histones peuvent servir de substrat mais, l'affinité est toutefois inférieure. Historiquement, deux catégories d'histone acétyltransférases ont été définies. Les HAT de type B ont une localisation cytoplasmique et acétylent les histones H4 avant leur entrée dans le noyau et leur dépôt sur l'ADN néosynthétisé. Les HAT de type A sont nucléaires et acétylent les histones déjà incorporées au sein de nucléosomes, ceci probablement en liaison avec les processus transcriptionnels. Toutefois, il semble que la séparation entre les deux groupes ne soit pas aussi nette (pour revue voir Sterner and Berger, 2000). Les HAT-A étant reliées à la transcription, seule cette catégorie sera abordée dans cette introduction. De

nombreux complexes HAT ont été isolés chez différents organismes. En dehors de leur activité sur les histones, les HAT sont également capables d'acétyler d'autres substrats dont des protéines qui se fixent sur la chromatine et des facteurs de la transcription (revue dans Sterner and Berger, 2000). L'acétylation de ces protéines régulent leur activité. Ainsi, les HAT participent à la régulation de transcription à plusieurs niveaux. Seules les modifications des histones seront abordées dans les paragraphes suivants.

III.2.1.1. Les HAT de levure.

La première activité HAT de type A a été isolée chez *T. thermophila*. La protéine p55 présentait de très fortes similitudes avec la protéine de levure Gcn5, alors considérée comme un régulateur transcriptionnel.

III.2.1.1.1. ADA.

Les complexes ADA et SAGA ont été purifiés biochimiquement conjointement. Les deux complexes partagent les sous-unités Gcn5 (homologue de la protéine p 55 de *T. thermophila*) Ada2 et Ada3. Le complexe ADA acétyle *in vitro* principalement les résidus lysine 14 et 18 de l'histone H3 et dans une moindre mesure l'histone H2B. Une quatrième sous-unité, Ahc1, spécifique du complexe ADA a été découverte récemment, démontrant ainsi que celui-ci n'est ni un sous-complexe ni un artéfact de purification de SAGA. Bien que la protéine Ahc1 soit indispensable à l'intégrité du complexe, la délétion du gène correspondant n'entraîne pas de défaut phénotypique marqué (Eberharter *et al.*, 1999 et références incluses). Le gène *AHC1* a été isolé dans un crible génétique de suppresseurs de mutations dans l'histone H2A. Ceci suggère un lien entre ADA et la chromatine, mais la fonction du complexe est encore mal comprise.

III.2.1.1.2. SAGA.

Le complexe SAGA se compose d'au moins une quinzaine de sous-unités et a une masse d'environ 1,8 MDa. Il a été dénommé ainsi car il contient des protéines appartenant aux familles Spt et Ada (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransférase). Le facteur SAGA ne contient pas la TBP mais une série de protéines qui lui sont associées dans le facteur de transcription TFIID, les TAFs (TBP Associated Factor). Les TAFs présents dans le complexe SAGA sont Taf20, Taf25, Taf60, Taf 68 et Taf 90. Ces protéines sont importantes pour la fonction de SAGA (revue dans Grant *et al.*, 1998). Le complexe SAGA contient également des protéines Ada (Ada1, Ada2, Ada3, Gcn5 et Ada5/Spt20), des protéines Spt (Spt3, Spt7, Stp8) et la protéine Tra1. Les protéines Taf 17, 25 et 68 et Ada1 présentent des motifs de type histone fold (Hoffmann *et al.*, 1996). Il a été proposé que ces protéines forment une structure de type nucléosome (voir II.5). L'activité HAT du complexe SAGA est portée par la protéine Gcn5 (Grant *et al.*, 1997). Le complexe SAGA acétyle *in vitro* préférentiellement l'histone H3 (sur les lysines 9, 14, 18 et 23) et dans une moindre mesure l'histone H2B. La spécificité des résidus acétylés sur l'histone H3 par le complexe SAGA le distingue du complexe ADA (Eberharther *et al.*, 1998 ; Grant *et al.*, 1999).

L'activité du complexe SAGA est ciblée au niveau de certains promoteurs par des interactions, notamment via ses sous-unités Ada, avec des activateurs transcriptionnels (Marcus *et al.*, 1994 ; Silverman *et al.*, 1994 ; Barlev *et al.*, 1995 ; Ikeda *et al.*, 1999 ; Kuo *et al.*, 2000). La protéine Tra1, essentielle à la viabilité cellulaire est homologue à la protéine humaine Trrap. Cette protéine se lie aux activateurs transcriptionnels c-Myc et E2F (McMahon *et al.*, 1998). La protéine Tra1 appartient également au complexe NuA4 (voir III.2.1.1.4). Elle est la cible d'activateurs transcriptionnels et joue un rôle important dans le ciblage des complexes HAT NuA4 et SAGA (Brown *et al.*, 2001). Il a été suggéré qu'elle serve de plate-forme pour l'interaction de ces complexes HAT avec les activateurs transcriptionnels. L'hypothèse d'un ciblage du complexe SAGA est également soutenue par les études de transcriptome qui montrent que ce complexe n'est requis que pour la transcription

d'un groupe de gènes. Il pourrait cependant y avoir des redondances fonctionnelles entre plusieurs activités de remodelage (Holstege *et al.*, 1998 ; Sudarsanam *et al.*, 2000). De plus, il a été montré que le complexe SAGA coopère avec des facteurs de remodelage de la chromatine comme SWI/SNF (Roberts and Winston, 1997 ; Cosma *et al.*, 1999 ; Gregory *et al.*, 1999 ; Krebs *et al.*, 1999 ; Sudarsanam *et al.*, 1999 ; Syntichaki *et al.*, 2000 ; Hassan *et al.*, 2001 ; Reinke *et al.*, 2001 ; voir IV.5). Des études *in vivo* sur le promoteur du gène *PHO5* ont montré que le bromodomaine de la protéine Gcn5 n'est pas nécessaire pour l'activité HAT mais intervient dans le remodelage subséquent par SWI/SNF en stabilisant la liaison de SWI/SNF au promoteur. (Syntichaki *et al.*, 2000 ; Hassan *et al.*, 2001).

Les sous-unités Spt3 et Spt8 interagissent avec la TBP. Une autre forme du complexe, dépourvue de Spt8, a été purifiée. Il semble cette sous-unité module l'activité du complexe en régulant la fixation de la TBP sur le promoteur (Belotserkovskaya *et al.*, 2000). La sous-unité catalytique Gcn5 n'est pas essentielle et sa délétion n'altère pas la stabilité du complexe. Par contre, des mutations dans les gènes *SPT3* et *SPT8* sont colétales avec la délétion de *GCN5* (Stern *et al.*, 1999). Il a été proposé que le complexe SAGA possède plusieurs fonctions. Seule la suppression de plusieurs activités aurait un effet délétère. Le complexe SAGA pourrait notamment participer à la stabilisation du complexe de transcription sur le promoteur. Notons qu'il a été proposé, sur la base d'études du transcriptome de mutants des protéines TAF_{II} communes à TFIID et SAGA, que ces deux complexes sont partiellement redondants (Lee *et al.*, 2000).

III.2.1.1.3. NuA3 (Nucleosome Acetyltransferase for H3).

Le complexe NuA3 a la capacité d'acétyler *in vitro* l'histone H3. Ce complexe est mal défini en termes de composition. La sous-unité catalytique, la protéine Sas3, (Something About Silencing 3) a été isolée (John *et al.*, 2000). Cette protéine est

capable d'acétyler *in vitro* les histones H3 et H4. En revanche, le complexe NuA3 n'accepte que l'histone H3 comme substrat. Ceci montre que les protéines associées régulent et modulent l'activité de la sous-unité catalytique. La protéine Sas3 appartient à une famille de protéines qui ont été impliquées dans le silencing au niveau des loci sexuels (Reifsnnyder *et al.*, 1996 ; John *et al.*, 2000).

Des interactions physiques et génétiques entre SAS3 et SPT16 ont été décrites (John *et al.*, 2000). L'acide mycophénolique et le 6-aza-uracile (6-azaU) permettent de mettre en évidence des défauts d'élongation de la transcription (revue dans Hampsey, 1997). La délétion de 306 codons en 5' du gène SPT16 confère une sensibilité au 6-azaU. Ce phénotype est aggravé par la délétion du gène SAS3 (John *et al.*, 2000). De plus, la partie N-terminale de la protéine Spt16 interagit en double-hybride avec la partie C-terminale de Sas3 (John *et al.*, 2000). L'homologue humain de Spt16 appartient au complexe FACT. Ce complexe de remodelage de la chromatine lève la répression due à la présence de nucléosome au cours de l'élongation de la transcription (Orphanides *et al.*, 1998). La protéine Elp4 (sous-unité de l'élongateur, voir chapitre sur ce complexe ci-dessous) est copurifiée avec le complexe NuA3. La présence potentielle de la sous-unité Elp4 ainsi que les interactions entre les gènes SAS3 et SPT16 suggèrent que le complexe NuA3 pourrait intervenir lors de la phase d'élongation de la transcription et jouer sur la processivité de l'ARN polymérase. D'autre part, les protéines de levure Spt16 et Pob3 s'hétérodimérisent pour former le complexe CP, copurifié avec l'ADN polymérase α . Cette association suggère que le complexe NuA3 pourrait aussi intervenir dans la réplication de l'ADN.

III.2.1.1.4. NuA4 (Nucleosome Acetyltransferase for H4).

Le complexe NuA4 acétyle préférentiellement les histones H4. Il est également capable d'utiliser l'histone H2 comme substrat mais avec une moindre affinité (Allard *et al.*, 1999). L'activité catalytique du complexe est portée par la protéine Esa1 (Essential SAS family Acetyltransferase 1). C'est la seule HAT essentielle à la viabilité

cellulaire connue à ce jour chez la levure, ce qui indique que le complexe NuA4 assure des fonctions spécifiques qui ne peuvent pas être prises en charge par d'autres complexes HAT ni compensées par d'autres activités de remodelage.

Comme cela a été démontré pour le complexe SAGA, l'activité de NuA4 peut être dirigée vers certains promoteurs via des interactions avec des activateurs transcriptionnels (Utley *et al.*, 1998 ; Ikeda *et al.*, 1999 ; Brown *et al.*, 2001 ; Carrozza *et al.*, 2002). Cette interaction s'accompagne d'une acétylation de la matrice ciblée. La protéine Tra1 qui appartient aux complexes SAGA et NuA4 est impliquée dans le ciblage de l'activité de ces complexes (Brown *et al.*, 2001).

III.2.1.1.5. L'élongateur.

L'élongateur est un complexe de levure composé de 6 protéines. Il a été découvert lors de la purification de la forme d'ARN polymérase II en élongation (Otero *et al.*, 1999 ; Wittschieben *et al.*, 1999 ; Winkler *et al.*, 2001). Les complexes d'initiation et les complexes ternaires (en élongation) sont dissociés de l'ADN à des concentrations ioniques différentes. À une concentration de 300mM d'acétate de potassium, les complexes d'initiation sont dissociés de l'ADN. En ajustant la concentration saline à 500mM, les complexes ternaires sont toujours accrochés à l'ADN et restent dans une fraction non soluble. L'ARN polymérase II en élongation est hyperphosphorylée sur le CTD. Cette forme de la pol II est détectée dans la fraction non soluble chromatinienne. L'élongateur se trouve à la fois dans les fractions solubilisées et non solubles. La forme hyperphosphorylée de la pol II est purifiée par une succession d'étapes chromatographiques à partir de la fraction non soluble de l'extrait. Les pics d'élutions de l'élongateur et de la forme hypophosphorylée de la pol II se superposent, ce qui suggère que ces deux complexes sont associés. Un complexe homologue à l'élongateur de levure a été purifié à partir de cellules humaines (Hawkes *et al.*, 2002). La sous-unité catalytique de l'élongateur, Elp3, n'a pas d'activité en dehors du complexe. Les autres sous-unités

sont nécessaires à l'activité du complexe (Hawkes *et al.*, 2002 ; Winkler *et al.*, 2002). L'élongateur de levure acétyle les histones H2A, H2B, H3 et H4. En revanche, l'élongateur humain a une activité spécifique sur l'histone H3 (majoritairement sur la lysine 14) et sur l'histone H4 (principalement sur la lysine 8 ; (Hawkes *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2002 ; Winkler *et al.*, 2002).

Un rôle dans l'élongation a été proposé du fait de l'association de ce complexe avec la forme hyperphosphorylée de l'ARN polymérase II. Si l'élongateur est effectivement un acteur de la transcription, son rôle est limité à un petit nombre de gènes. Une étude du transcriptome de mutants *elp* par puces à ADN a en effet montré que l'élongateur n'est requis pour la transcription que d'un nombre restreint de gènes (Krogan and Greenblatt, 2001). Seule la sous-unité Elp5 est essentielle. La délétion des autres sous-unités provoque une croissance ralentie, un accroissement du temps d'adaptation aux changements de milieux et des défauts d'activation de certains gènes (Otero *et al.*, 1999 ; Wittschieben *et al.*, 1999). La délétion des gènes *ELP5* et *DST1* (codant le facteur de transcription TFIIS impliqué dans l'élongation et l'activité de clivage) est létale en présence de 6-azaU. Par ailleurs, la sous-unité Rpb9 de l'ARN polymérase II a des similitudes avec le facteur TFIIS. Des mutations dans le gène *RPB9* sont colétales avec la délétion du gène *ELP3* (Van Mullem *et al.*, 2002). Ces données évoquent un rôle du complexe ELP dans l'élongation de la transcription. Cette hypothèse a été remise en question par les travaux de Pokholok et collaborateurs (Pokholok *et al.*, 2002). Ces auteurs ont utilisé la technique d'immunoprécipitation de chromatine et d'hybridation sur puces à ADN pour analyser le recrutement de facteurs de transcription, d'initiation, et d'élongation. Ils n'ont pas pu détecter la présence de l'élongateur. De plus, ce complexe a une localisation majoritairement cytoplasmique. Il a été proposé que l'élongateur puisse agir à de faibles niveaux ou qu'il soit relocalisé au niveau du noyau dans certaines conditions. Une autre possibilité est que l'activité de l'élongateur possède une activité HAT de type B, impliqué dans l'acétylation des histones avant leur incorporation dans les nucléosomes et que la copurification avec la pol II soit artéfactuelle.

III.2.1.2. Les HAT d'eucaryotes supérieurs.

Des homologues de Gcn5 ont été clonés dans de nombreux organismes, ce qui suggère une conservation de sa fonction dans l'évolution (revue dans Sterner and Berger, 2000). Chez les mammifères deux homologues de Gcn5 ont été identifiés. Il s'agit des protéines hGcn5 et Pcaf. Elles se distinguent de leur homologue de levure par la présence d'une longue partie N-terminale non présente chez la levure. La protéine Pcaf interagit avec deux autres HAT humaines, p300 et Cbp. Les protéines hGcn5 et Pcaf appartiennent à des deux complexes de compositions voisines et homologues à SAGA (Ogryzko *et al.*, 1998). Deux autres complexes, STAGA et TFTC, contenant hGcn5, ont été purifiés. La composition du complexe STAGA est mal définie mais il a été montré qu'il contient la TBP. Le complexe TFTC partage certaines sous-unités avec PCAF et GCN5. Il contient par ailleurs un jeu de TAF_{II} qui lui sont spécifiques, ce qui indique que ces différents complexes ne sont pas identiques.

III.2.2. Les histone déacétylases (HDAC).

Le corollaire de l'effet de l'acétylation des histones sur l'activation de la transcription est que la déacétylation de ces résidus entraîne une répression transcriptionnelle. De la même manière que de nombreuses histone acétyltransférases ont été initialement isolées comme des coactivateurs transcriptionnels, beaucoup de corépresseurs de la transcription ont des activités histone déacétylases.

La protéine humaine Hdac1 est la première histone déacétylase à avoir été isolée (Taunton *et al.*, 1996). Son homologue chez *S. cerevisiae*, la protéine Rpd3, est nécessaire à l'activation et la répression de nombreux gènes (Vidal and Gaber, 1991). La réunion des informations biochimiques sur Hdac1 et génétiques sur Rpd3 a fourni la première connexion entre répression de la transcription et déacétylation des

histones. Des études ont également montré que la protéine Rpd3 possède également une activité HDAC (Rundlett *et al.*, 1996).

Les histone déacétylases se classent en trois catégories. La première classe, à laquelle appartiennent les protéines humaines Hdac1, Hdac2, Hdac3 et Hdac8, est définie par la protéine de levure Rpd3. La classe II contient les protéines humaines Hdac5, Hdac6, Hdac7 et Hdac9, homologues à la déacétylase de levure Hda1 (pour revue, voir Khochbin *et al.*, 2001). Les histone déacétylases de classe I et II font partie de complexes multiprotéiques. Les différentes HDAC sont capables de déacétyler les histones H2A, H2B, H3 et H4. Les autres composants du complexe déterminent leur spécificité de substrat. Notons que les protéines Hdac1 et Hdac2 des mammifères appartiennent toutes les deux à deux complexes distincts : Sin3A et NuRD. Ce dernier possède également une activité de remodelage de la chromatine (voir IV.3.2.).

Le troisième groupe de déacétylases est constitué des protéines homologues à la protéine de levure Sir2. Il a été récemment démontré que cette protéine possède *in vitro* une activité déacétylase dépendante du NAD et est capable de déacétyler les histones H3 et H4 (Smith and Boeke, 1997 ; Imai *et al.*, 2000 ; Landry *et al.*, 2000 ; Smith *et al.*, 2000). L'existence d'une telle activité *in vivo* n'a pas été établie.

Une étude récente par puces à ADN montre que les différentes HDAC de *S. cerevisiae* assurent des fonctions distinctes et interviennent aux niveaux de loci particuliers (Robyr *et al.*, 2002). Des interactions ont été démontrées entre des répresseurs transcriptionnels et des complexes HDAC. Par exemple, le répresseur transcriptionnel de levure Ume6 interagit avec le complexe Sin3-Rpd3. Ce recrutement aboutit à la répression de l'expression d'un groupe de gènes contrôlés par Ume6 (Kadosh and Struhl, 1997 ; Fazzio *et al.*, 2001). De même, la protéine Rb recrute le complexe mSin3A au niveau de gènes dont l'expression est régulée par le facteur de transcription E2F, ce qui conduit à la répression de leur transcription (Brehm *et al.*, 1998 ; Luo *et al.*, 1998 ; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998). Il apparaît donc

que les histone acétyltransférases et histone déacétylases peuvent exercer une activité ciblée après un recrutement par des régulateurs transcriptionnels.

III.3. La méthylation des histones.

La méthylation est un transfert d'un groupement méthyl depuis la S-adénosylméthionine vers la protéine cible. Les histones peuvent être méthylées par des histone méthyltransférases (HMT) au niveau de résidus lysine ou arginine (figure 13). Contrairement à l'acétylation, la méthylation ne modifie pas la charge globale des histones. Des modèles faisant intervenir des clivages protéolytiques permettant de retirer cette signature de la chromatine ont été proposés (pour revue, voir Jenuwein and Allis, 2001). Il semble cependant que la méthylation puisse être réversible bien qu'aucune histone déméthylase n'ait été encore isolée.

Comme l'acétylation, la méthylation des histones a été corrélée à la régulation de la transcription. Cependant, la méthylation des histones n'a pas comme conséquence systématique une activation transcriptionnelle. Le résidu, son emplacement, le nombre de méthylation ainsi que la combinaison avec d'autres modifications covalentes des histones déterminent l'effet transcriptionnel.

Les premières histone méthyltransférases agissant sur les résidus lysine à avoir été isolées sont les protéines Suv39H1 humaine et murine (Aagaard *et al.*, 1999). Ces protéines méthylent *in vitro* la lysine 9 de l'histone H3 (Rea *et al.*, 2000) et sont des homologues de suppresseurs de l'effet de variégation chez la drosophile et *S. pombe*. Plusieurs familles d'histone méthyltransférases ont été identifiées, contenant toutes un motif SET nécessaire à l'activité (Rea *et al.*, 2000). Chaque famille a probablement une spécificité de substrat (histone et résidu ; pour revue, voir Kouzarides, 2002).

La méthylation du résidu lysine 9 de l'histone H3 a été associée à la formation d'hétérochromatine. Cette modification est reconnue par le répresseur transcriptionnel Hp1 chez la drosophile et les mammifères, par son homologue Swi6 chez *S. pombe*, et peut entraîner la formation d'hétérochromatine (Bannister *et al.*,

2001 ; Lachner *et al.*, 2001). La méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 n'est pas détectée chez *S. cerevisiae*. Les protéines Suv39H1 et Hp1 sont également impliquées dans la répression transcriptionnelle de l'euchromatine. La protéine humaine Rb interagit *in vivo* avec ces deux protéines. Cela a pour conséquence de réprimer l'expression du gène de la cycline E (Nielsen *et al.*, 2001). La présence de la protéine Rb est nécessaire pour que la méthylation de la lysine 9 s'effectue. Toutefois, contrairement à ce qui se passe aux loci hétérochromatiques, la répression du gène de la cycline E par Suv39H1-Hp1 n'entraîne pas la formation d'hétérochromatine. Le recrutement d'activité HDAC par la protéine Rb suggère qu'elle agit probablement en faisant intervenir une étape de déacétylation de la lysine 9 (Brehm *et al.*, 1998 ; Luo *et al.*, 1998 ; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998).

L'histone H3 peut également être méthylée sur la lysine 4. Contrairement à la méthylation de la lysine 9, la méthylation de la lysine 4 semble avoir un effet activateur sur la transcription. En effet, cette lysine est méthylée dans le macronoyau transcriptionnellement actif de la paramécie *T. thermophila* (Strahl *et al.*, 1999). Chez *S. pombe*, une méthylation de la lysine 4 est détectée dans l'euchromatine. Cette méthylation de l'histone H3 est fréquente chez *S. cerevisiae*. Il semble qu'elle soit associée à la fois à l'activation et la répression transcriptionnelle. Le nombre de méthylation d'un résidu joue un rôle capital. La lysine 4 est en effet diméthylée dans les régions codantes. Il semble qu'elle participe à l'activation transcriptionnelle en bloquant la déacétylation des régions concernées (Bernstein *et al.*, 2002 ; Dover *et al.*, 2002). Mais la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est également requise chez *S. cerevisiae* pour que l'extinction transcriptionnelle de l'ADNr et des télomères s'effectue (Briggs *et al.*, 2001 ; Krogan *et al.*, 2002). La lysine 26 de l'histone H3 semble liée à une répression transcriptionnelle (Strahl *et al.*, 2002).

Des histone méthyltransférases possédant une activité ciblée spécifiquement sur les résidus arginine ont été isolées. Ceci a fourni les premières indications en faveur d'un rôle dans la méthylation des arginines des histones dans l'activation transcriptionnelle. Ces histone méthyltransférases sont coactivateurs des récepteurs

nucléaires des eucaryotes supérieurs (Chen *et al.*, 1999 ; Ma *et al.*, 2001 ; Bauer *et al.*, 2002).

III.4. La phosphorylation des histones.

La phosphorylation des histones, comme leur acétylation, modifie leur charge. La fonction de la phosphorylation de l'histone H3 n'est pas claire. La modification de la sérine 10 a été impliquée dans la condensation (Hendzel *et al.*, 1997 ; Van Hooser *et al.*, 1998 ; Wei *et al.*, 1998 ; Wei *et al.*, 1999) et dans la cohésion des chromosomes (Kaszas and Cande, 2000). Cependant un rôle direct de cette phosphorylation a été remis en cause (De la Barre *et al.*, 2001).

La phosphorylation des histones a aussi été impliquée dans l'activation transcriptionnelle (revues dans Spencer and Davie, 1999 ; Berger, 2001). Chez les mammifères, la stimulation de cellules au repos par des facteurs de croissance conduit à la phosphorylation des nucléosomes présents sur les gènes *c-FOS* et *c-MYC*. Cette phosphorylation est concomitante de l'activation transcriptionnelle de ces deux gènes (Mahadevan *et al.*, 1991 ; Chadee *et al.*, 1999 ; Sassone-Corsi *et al.*, 1999).

La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 module l'activité d'acétylation. Des études chez *S. cerevisiae* ont montré que certains gènes dont l'activation est dépendante de l'histone acétyltransférase Gcn5 sont également dépendants de la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (Lo *et al.*, 2000). La mutation de cette sérine en alanine affaiblit la transcription de ce groupe de gènes. L'arginine R164 de la protéine Gcn5 se trouve à proximité de la sérine 10 de l'histone H3 dans le complexe ternaire Gcn5/Aco-A/H3 (Lo *et al.*, 2000). La mutation de cette arginine en alanine provoque une baisse de l'activité HAT sur ce même groupe de gène. D'autre part, l'activité de Gcn5 est stimulée si la sérine 10 est préalablement phosphorylée (Cheung *et al.*, 2000 ; Lo *et al.*, 2000). Il existe donc des coopérations

entre les différentes machineries de modifications des histones qui permettent de réguler leurs activités.

III.5. Histones et ubiquitine.

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 résidus, extrêmement conservée et retrouvée dans la très grande majorité des espèces eucaryote. Elle a été principalement impliquée dans des processus qui font intervenir une dégradation protéique (le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation cellulaire, la réponse au stress, la réparation de l'ADN... ; pour revue, voir Glickman and Ciechanover, 2002). Une autre fonction, ne faisant pas intervenir les voies de dégradation protéique, lui a été attribuée dans la transcription et la structure de la chromatine. L'histone H2A est la toute première protéine conjuguée à l'ubiquitine à avoir été isolée (Ballal *et al.*, 1975). Les résidus ubiquitinés des histones sont situés au début de la partie C-terminale et non dans la queue amino-terminale (pour nommer les histones ubiquitinées, j'utiliserai l'abréviation uH). Contrairement aux réactions d'acétylation et de méthylation pour lesquelles des motifs protéiques reconnaissent les résidus modifiés covalamment, aucun motif de reconnaissance des histones ubiquitinées n'a été identifié. Cependant, on peut proposer l'existence d'un mécanisme similaire. L'histone H2A peut également être conjuguée à l'ubiquitine sur la lysine K119. Bien que ce résidu soit remarquablement bien conservé, la forme uH2A n'est pas détectée chez la levure (Swerdlow *et al.*, 1990). L'histone H2B peut être ubiquitinée sur la lysine K120 chez les mammifères ou K123 chez la levure (Robzyk *et al.*, 2000).

L'effet de l'ubiquitination des histones est variable. Plusieurs études ont mis en évidence un taux accru d'histones ubiquitinées dans la chromatine transcriptionnellement active (Levinger and Varshavsky, 1982 ; Nickel *et al.*, 1989). Chez *T. thermophila*, le macronoyau est enrichi en histones ubiquitinées comparativement au micronoyau transcriptionnellement inactif (Nickel *et al.*, 1989 ; Davie and Murphy, 1990). Un autre argument en faveur d'un rôle positif de

l'ubiquitination des histones sur la transcription est venu de l'étude de cellules soumises à un choc thermique. Lors d'un tel stress, la transcription de beaucoup de gènes est réprimée. Cela a été corrélé à une diminution du taux d'acétylation et de la quantité d'uH2A dans plusieurs lignées cellulaires (Parag *et al.*, 1987 ; Bond *et al.*, 1988 ; Mimnaugh *et al.*, 1997). Il a été observé un biais dans la teneur en ubiquitine dans la chromatine transcriptionnellement active : les parties 5' des gènes actifs en sont plus riches que les parties 3'. Ces expériences suggèrent une corrélation positive entre ubiquitination et activation de la transcription. Cependant, ce lien n'est pas absolu. Des histones ubiquitinées sont en effet également détectées dans des fragments transcriptionnellement inactifs (Ballal *et al.*, 1975 ; Levinger and Varshavsky, 1982 ; Huang *et al.*, 1986). D'autre part, chez la levure, l'ubiquitination de la lysine 123 de l'histone H2B précède et est nécessaire pour que la méthylation de la lysine 4 et l'extinction transcriptionnelle des télomères s'effectuent (Sun and Allis, 2002). Comme pour les autres modifications covalentes des histones, l'effet d'une ubiquitination sur la transcription est donc variable.

Une ou deux histones ubiquitinées peuvent s'intégrer au sein d'un nucléosome. Des expériences de digestion à la DNase n'ont pas permis de détecter de différences de liaison à l'ADN entre les formes nucléosomales "natives" et ubiquitinées des nucléosomes (Davies and Lindsey, 1994). Il semble cependant que la présence d'ubiquitine fragilise le dimère H2A/H2B dans la chromatine transcriptionnellement active (Li *et al.*, 1993). Il a été proposé que l'ubiquitination puisse être un mécanisme favorisant l'échange avec des histones néosynthétisées, la fixation de facteur de transcription ou l'élongation en cours de transcription.

Chez la levure, deux protéines sont capables d'ubiquitiner des histones *in vitro*. Il s'agit des protéines Rad6/Ubc2 et Cdc34/Ubc3. Des travaux réalisés par Robzyk et collaborateurs ont révélé que Rad6 est l'enzyme responsable de la conjugaison de l'ubiquitine à l'histone H2B au niveau du résidu K123 *in vivo* (Robzyk *et al.*, 2000). Des travaux récents chez la drosophile ont montré que le facteur de transcription TFIID, par l'intermédiaire de sa sous-unité TAF_{II}250, possède en plus de ces activités

acétylase et kinase, une activité intrinsèque *in vitro* d'ubiquitination de l'histone H1 (Pham and Sauer, 2000).

La deuxième catégorie de modification de la structure chromatinienne met en jeu des complexes de remodelage spécialisés. Ces facteurs de remodelage de la chromatine sont caractérisés par la présence d'une sous-unité ATPase ADN-dépendante de la famille de Swi2/Snf2 (pour revue voir Kingston and Narlikar, 1999 ; Narlikar *et al.*, 2002). Ces complexes utilisent l'énergie de l'hydrolyse d'ATP pour opérer des réarrangements des nucléosomes et de l'enroulement de l'ADN au sein de la chromatine.

IV. Remodelage de la chromatine par des complexes ATP-dépendants.

IV.1. Le complexe SWI/SNF.

IV.1.1. Isolement du complexe.

Le complexe SWI/SNF (pour mating type **SW**itching/**S**ucrose **N**on **F**ermenting) est le premier complexe de remodelage de la chromatine à avoir été isolé chez la levure. Plusieurs composants de ce complexe ont été originellement identifiés dans des cribles génétiques comme des régulateurs positifs de la transcription du gène de l'endonucléase *HO* (gènes de la famille SWI) ou de l'invertase *SUC2*, requise pour la croissance sur saccharose (gènes de la famille SNF ; pour revue, voir Winston and Carlson, 1992). Des études génétiques et biochimiques ont par la suite montré que ces différentes protéines forment un même complexe, composé d'au moins 11 sous-unités et d'une masse moléculaire d'environ 2 MDa (Côté *et al.*, 1994). Chez *S. cerevisiae*, SWI/SNF n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire. Les mutations dans les différentes sous-unités donnent des phénotypes très variés (défauts de croissance, incapacité à utiliser certaines sources de carbone, défauts dans le changement de type sexuel).

L'étude de mutants du complexe SWI/SNF a permis d'établir un lien entre ce complexe et le remodelage de la chromatine. Les gènes du groupe SIN sont définis comme des supprimeurs du phénotype *swi/snf*-. Plusieurs mutations *sin* correspondent à des mutations dans les gènes codant les histones H3 et H4 (Winston

and Carlson, 1992). La déplétion partielle des histones H2A et H2B permet également de supprimer ce phénotype (Hirschhorn *et al.*, 1992). Ces données suggèrent donc que la déstabilisation de la structure chromatinienne et le fonctionnement de SWI/SNF sont liés. Des expériences de sensibilité de la chromatine à la digestion par des nucléases sur le gène *SUC2* ont démontré la "fonction chromatinienne" de SWI/SNF. L'activation de la transcription du gène s'accompagne d'un changement du profil de digestion. Des mutations dans les gènes codant les sous-unités Snf2 ou Snf5 abolissent à la fois l'induction transcriptionnelle et la modification de la structure chromatinienne du gène *SUC2*. Celles-ci sont en partie rétablies lorsque la quantité d'histones H2A et H2B est artificiellement diminuée (Hirschhorn *et al.*, 1992 ; Wu and Winston, 1997). Ces différentes observations font penser que les nucléosomes sont déplacés, permettant ainsi l'accès de la machinerie de transcription. Le complexe SWI/SNF est capable de stimuler la fixation d'un activateur transcriptionnel dérivé de Gal4. Il a été établi que SWI/SNF est capable de modifier le positionnement et la structure des nucléosomes de manière ATP-dépendante (revue dans Kingston and Narlikar, 1999). L'activité ATPase est portée par la sous-unité Swi2/Snf2 (Laurent *et al.*, 1993). Cette protéine définit une classe d'ATPase impliqué dans le remodelage de la chromatine .

IV.1.2. SWI/SNF et transcription.

La perte de fonction de SWI/SNF se traduit par des phénotypes très variés. Des études récentes par puces à ADN ont montré que SWI/SNF n'a pas un rôle général dans la transcription. Il n'est requis (directement ou indirectement) pour la transcription que de 3 à 6 % des gènes selon les études (Holstege *et al.*, 1998 ; Sudarsanam *et al.*, 2000). De plus, SWI/SNF a un rôle positif et négatif sur la transcription. Ceci indique que ce complexe contribue à rendre l'ADN plus ou moins accessible selon les gènes. Les effets transcriptionnels observés sont la résultante d'effets directs et indirects (via des régulateurs pour ces derniers). Une partie des

dérégulations observées est due non pas à l'action de SWI/SNF au niveau d'un gène particulier, mais à l'action de SWI/SNF sur la transcription de certains régulateurs. Par exemple, les protéines Pho2 et Pho4 sont des activateurs transcriptionnels du gène *PHO5*. Dans un mutant *snf2-Δ* cultivé en milieu riche, l'expression du gène *PHO5* est réprimée, mais celles des gènes *PHO2* et *PHO4* ne varie pas. La répression de *PHO5* est donc bien liée à une intervention directe de SWI/SNF au niveau de ce gène. Inversement, pour les gènes transcrits spécifiquement dans les souches du type sexuel **a**, la diminution de la quantité de ces transcrits est provoquée par la répression de la transcription de leurs régulateurs (Sudarsanam *et al.*, 2000).

La répartition dans le génome des gènes dont la transcription est dépendante de SWI/SNF est homogène. Ceci montre que ce complexe ne régit pas la transcription de domaines chromatinien particuliers, mais que ce contrôle s'exerce individuellement sur chaque gène (Holstege *et al.*, 1998 ; Sudarsanam *et al.*, 2000).

Le fait que SWI/SNF ne soit pas requis pour la transcription de la totalité du génome indique soit qu'il n'intervient effectivement qu'au niveau d'un nombre restreint de gènes, soit que sa fonction est partiellement redondante avec celle d'un autre facteur (de remodelage ou de modification des histones).

En dehors de ces fonctions transcriptionnelles, le complexe SWI/SNF semble également impliqué dans la réplication de l'ADN (Flanagan and Peterson, 1999). Cet aspect ne sera pas davantage développé ici.

IV.2. Le complexe RSC (Remodels the Structure of Chromatin).

IV.2.1. RSC, un homologue de SWI/SNF.

RSC est un complexe d'environ 1MDa isolé chez la levure sur la base des similitudes de sa sous-unité catalytique Sth1 avec la protéine Swi2/Snf2 du complexe SWI/SNF (Cairns *et al.*, 1996). Des expériences de sensibilité à la digestion par la

DNase I montre que ce complexe est capable *in vitro* de remodeler de manière ATP-dépendante la structure de la chromatine (Cairns *et al.*, 1996). Le complexe RSC est composé d'au moins 18 sous-unités (Cairns *et al.*, 1996 ; Sanders *et al.*, 2002). Les gènes codant treize d'entre elles sont connus. En plus de Sth1, plusieurs autres sous-unités de RSC ressemblent à des sous-unités de SWI/SNF. Le tableau III montre la composition de quelques complexes de la famille SWI/SNF. Les sous-unités Sth1, Sfh1, Rsc8 et Rsc6 sont homologues respectivement à Swi2/Snf2, Snf5, Swi3, et Swp73. Les deux complexes partagent également deux protéines apparentées à l'actine, Arp7 et Arp9 (aussi nommées Rsc11/Swp61 et Rsc12/Swp59). Ces deux protéines, bien que capables d'hydrolyser l'ATP, semblent avoir un rôle plus structural que catalytique (Peterson *et al.*, 1998). Par ailleurs, le complexe RSC compte au moins 6 sous-unités spécifiques : Rsc1, Rsc2, Rsc3, Rsc4, Rsc30 et Rsc58.

Malgré leur ressemblance, les complexes SWI/SNF et RSC ne sont pas redondants. En effet, contrairement à SWI/SNF, le complexe RSC est essentiel pour la croissance mitotique. D'autre part, l'estimation des rendements de purification suggère que RSC est au moins dix fois plus abondant dans la cellule que SWI/SNF. Ceci permet d'émettre l'hypothèse que RSC pourrait agir soit au niveau de nombreux promoteurs soit être impliqué dans plusieurs autres processus agissant au niveau de l'ADN comme la réparation ou la réplication de l'ADN.

Le complexe RSC existe sous plusieurs isoformes. La purification du complexe à partir d'anticorps dirigés contre la sous-unité Rsc6 fait apparaître deux formes distinctes de RSC. La forme RSCa est dépourvue des polypeptides Rsc3 et Rsc30 et représente 10 à 20 % de la quantité de complexe purifié (Cairns *et al.*, 1996 ; Angus-Hill *et al.*, 2001). Les complexes RSC et RSCa ont des propriétés extrêmement proches (Cairns *et al.*, 1996).

Par ailleurs, il existe aussi deux autres isoformes de RSC qui contiennent soit la protéine Rsc1 soit la protéine Rsc2. L'isoforme contenant la protéine Rsc2 est la plus abondante. Les protéines Rsc1 et Rsc2 sont fortement similaires et ne sont pas essentielles. Toutefois, la délétion des gènes *RSC1* ou *RSC2* confère des défauts de croissance spécifiques. La délétion simultanée des deux gènes est par contre létale (Cairns *et al.*, 1999). Les protéines Rsc1 et Rsc2 partagent donc des fonctions communes mais ne sont pas totalement redondantes et interchangeables. Chacune contient deux bromodomaines (III.1) et un domaine de type BAH. Ce dernier est un motif protéique d'environ 130 résidus qui a été originellement identifié dans les protéines Polybromo humaine et Rsc2 de levure. (Nicolas and Goodwin, 1996). La présence dans ces deux protéines de bromodomaines a conduit à nommer ce motif "**Bromodomain Adjacent Homology**". Le motif BAH, retrouvé chez tous les eucaryotes, est présent dans un grand nombre de protéines qui possèdent par ailleurs soit un domaine impliqué dans la régulation transcriptionnelle soit des motifs de liaison à l'ADN. Ceci suggère un rôle dans la régulation de la transcription (pour revue, voir Callebaut *et al.*, 1999). Les protéines Rsc1, Rsc2 et Polybromo sont toutefois les seuls polypeptides connus possédant à la fois des bromodomaines et des motifs BAH (Goodwin and Nicolas, 2001). Il a été proposé que ce motif soit un module d'interaction protéine-protéine impliqué dans la régulation transcriptionnelle (Callebaut *et al.*, 1999). Notons également que les protéines Rsc1 et Rsc2 contiennent aussi un crochet AT (AT-hook). Il s'agit d'un motif de liaison à l'ADN qui reconnaît préférentiellement les sillons mineurs de régions riches en nucléotides A et T (Reeves and Nissen, 1990).

Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées sur les deux isoformes du complexe. Elles ne font pas apparaître de différences flagrantes dans la localisation des complexes contenant les protéines Rsc1 ou Rsc2 (Ng *et al.*, 2002). La non redondance de Rsc1 et Rsc2 suggère alors que les deux complexes agissent différemment au niveau de quelques loci et/ou qu'ils assurent des fonctions spécifiques autres que transcriptionnelles.

IV.2.2. Un homologue humain pour RSC ?

Les cellules de mammifères contiennent deux ATPases de type Swi2/Snf2, Brg1 et Brm. Trois complexes humains ont été purifiés à partir de deux fractions chromatographiques distinctes de cellules HeLa (tableau III ; figure 16 ; Wang *et al.*, 1996a ; Wang *et al.*, 1996b). La première fraction contient deux complexes très proches qui ont comme sous-unité ATPase respective les protéines Brg1 et hBrm. Ces deux complexes ont des propriétés biochimiques voisines et sont tous les deux nommés SWI/SNF-A ou BAF (**Brg1 Associated Factor**). Ces complexes ont, en dehors de l'ATPase, des compositions similaires. La deuxième fraction ne comporte qu'un seul complexe, SWI/SNF-B ou PBAF (**PolyBromo Associated Factor**), dont l'ATPase est Brg1 (Xue *et al.*, 2000). Les formes A et B contiennent chacune des sous-unités spécifiques. La protéine Baf250 n'est présente que dans les complexes de la forme A. Les polypeptides Baf180, Baf200 et Baf240 sont quant à eux caractéristiques du complexe SWI/SNF-B (Xue *et al.*, 2000). La protéine Baf180 a la particularité de posséder 6 bromodomains, deux motifs BAH ainsi qu'un module HMG (High Mobility Group ; figure 14). Les protéines de drosophile CG11375 et de *C. elegans* CE05310 ont des organisations similaires à celle de Baf 180. Par contre, aucune protéine de levure ne possède ces 9 motifs. Chez *S. cerevisiae*, les protéines les plus ressemblantes sont les sous-unités Rsc1, Rsc2 et Rsc4 du complexe RSC (Xue *et al.*, 2000). Il a été proposé que la protéine Baf180 résulte d'une fusion de ces trois protéines au cours de l'évolution (Xue *et al.*, 2000). Le complexe SWI/SNF-B serait donc l'homologue humain de RSC.

Bien qu'elles présentent 75% d'identité, les ATPases Brg1 et Brm ne semblent pas avoir les mêmes rôles biologiques. L'inactivation du gène *BRM* chez la souris est viable. Cette inactivation s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la protéine Brg1, ce qui évoque un mécanisme de compensation entre les deux formes de complexes SWI/SNF-A qui permettrait de pallier l'absence de l'ATPase Brm. Toutefois, les cellules *brm* *-/-* présentent des défauts de contrôle du cycle cellulaire. Ces cellules perdent l'inhibition de contact *in vitro* et les souris *brm* *-/-* sont

prédisposées au développement de tumeurs. Contrairement au gène *BRM*, l'inactivation du gène *BRG1* induit une létalité embryonnaire. Cette létalité rappelle le caractère essentiel du complexe RSC. Le complexe SWI/SNF-B ne contient que l'ATPase Brg1. L'effet délétère de la délétion du gène *BRG1* suggère que les deux ATPases Brm et Brg1 ne sont pas interchangeables au sein du complexe SWI/SNF-B et que les trois complexes SWI/SNF ne sont pas redondants. Toutefois, l'inactivation du gène *BGR1* est possible dans certains types cellulaires, ce qui indique que sa fonction n'est pas requise de manière absolue dans tous les types cellulaires (pour revue, voir Muchardt and Yaniv, 2001).

IV.2.3. Rôle transcriptionnel de RSC.

Le complexe RSC a été impliqué dans le contrôle de la transcription. Il faut noter que, par opposition à ce qui a été rapporté pour les complexes SWI/SNF humains et de levure, le complexe RSC n'a pas été copurifié avec l'ARN polymérase II de levure (Cairns *et al.*, 1996 ; Wilson *et al.*, 1996 ; Neish *et al.*, 1998). Le mutant *nps1-105* (mutant de la sous-unité catalytique Sth1) est affecté dans le processus de sporulation. Ce mutant présente un taux de sporulation réduit et un délai dans le déclenchement de la méiose. Ce phénotype s'accompagne de défauts transcriptionnels pour les gènes *IME2*, *SPO11* et *SPO13*, induits en tout début de méiose. Moreira et Holmberg ont montré que RSC est impliqué dans le contrôle de la transcription du gène *CHA1* (Moreira and Holmberg, 1999). Ce gène est fortement induit lorsque les cellules sont cultivées en présence de sérine dans le milieu. Lorsque les protéines Sth1 ou Rsc8 sont déplétées, l'expression du gène *CHA1* dans des cellules non induites est comparable à celle des cellules induites. Ceci suggère que la répression de la transcription du gène n'a plus lieu. Ces changements transcriptionnels sont corrélés avec des perturbations de la structure chromatinienne du promoteur. En condition standard, un nucléosome est placé sur la boîte TATA. L'induction de la transcription du gène s'accompagne d'un déplacement de ce

nucléosome. Lorsque les protéines Sth1 ou Rsc8 sont déplétées, ce déplacement est observé quelles que soient les conditions de croissance. Le remodelage du promoteur effectué par le complexe RSC est donc requis pour la répression de la transcription du gène *CHA1*. Ceci montre de plus que le complexe RSC peut avoir un effet négatif sur la transcription.

Des études du transcriptome sur des mutants de *RSC3*, *RSC30* et *RSC9* suggèrent qu'il existe une spécialisation des sous-unités au sein du complexe. Les ensembles de gènes affectés dans ces différents mutants ne sont pas entièrement identiques, ce qui suggère que certaines sous-unités sont responsables du ciblage de l'activité de remodelage de RSC au niveau de certains gènes.

La localisation du complexe RSC au niveau des régions intergéniques a été analysée par la technique d'immunoprécipitation de chromatine combinée à une hybridation sur puces à ADN à partir de plusieurs sous-unités du complexe (Damelin *et al.*, 2002 ; Ng *et al.*, 2002). L'immunoprécipitation de chromatine permet de déterminer quels sont les fragments d'ADN auxquels une protéine se fixe. Les cellules sont fixées avec du formaldéhyde. Cette étape permet de ponter à l'ADN les protéines qui s'y lient. Les cellules sont lysées par sonication (cette étape permet également de fragmenter l'ADN). La protéine d'intérêt est immunoprécipitée (fraction enrichie) à l'aide d'anticorps spécifiques ou dirigés contre un épitope. Ceci permet de concentrer les fragments liés par cette protéine. Les fragments d'ADN de la fraction enrichie et d'une fraction non enrichie sont amplifiés et marqués avec des fluorochromes puis hybridés simultanément sur une puce à ADN (Ren *et al.*, 2000).

Les résultats des deux études sur RSC sont en partie divergents. Les auteurs ont souligné la difficulté de ponter le complexe RSC à l'ADN. Cette difficulté pourrait expliquer les divergences entre les deux études. D'autre part, cela entraîne une certaine incertitude sur les cibles de RSC. Néanmoins, ces études indiquent que RSC est impliqué dans la transcription de gènes codant des protéines ribosomiques, des

protéines impliquées dans l'utilisation des différentes sources d'azote, de réponse aux stress, dans le maintien de la paroi cellulaire, ainsi que de plusieurs gènes liés au cycle cellulaire. Ces résultats concordent avec les résultats d'analyse du transcriptome de mutant de *rsc3* et *rsc30*. D'autre part, la localisation de Rsc9 change en réponse à différents stress. Cela indique que RSC est ciblé vers différents gènes en fonction des conditions de culture.

L'étude menée par Ng et collaborateurs révèle également que RSC occupe de manière privilégiée les régions situées en amont des gènes transcrits par l'ARN polymérase III (Ng *et al.*, 2002). Le complexe RSC aurait la particularité de participer à la transcription par l'ARN polymérase II et l'ARN polymérase III. En revanche, aucune occupation du promoteur de l'ADNr n'a été constatée.

IV.2.4. RSC et le cycle cellulaire.

Des études suggèrent une implication du complexe RSC dans le cycle cellulaire. Différents mutants des sous-unités Rsc1, Rsc2, Rsc9, Rsc3, Rsc30, Sth1 sont bloqués à la transition G2/M (Cao *et al.*, 1997 ; Du *et al.*, 1998 ; Tsuchiya *et al.*, 1998 ; Cairns *et al.*, 1999 ; Angus-Hill *et al.*, 2001 ; Damelin *et al.*, 2002). Ce blocage est dû à l'activation d'un "point de contrôle" du fuseau mitotique (généralement activé par un mauvais accrochage d'un chromosome aux microtubules ou suite à des dommages au fuseau mitotique). Les mutants *nps1-105* et *sth1-3ts* sont sensibles aux drogues déstabilisant les microtubules (Tsuchiya *et al.*, 1998 ; Hsu and Laurent, 2002). Dans le mutant *nps1-105*, la structure chromatinienne autour du centromère est perturbée. Ce changement est détecté par une modification du profil de digestion des régions centromériques par des nucléases et des enzymes de restriction. Cette altération n'est pas apparemment due à une perte de nucléosomes dans les régions centromériques (Tsuchiya *et al.*, 1998). Par ailleurs, une étude récente a montré l'existence d'interactions physiques et génétiques entre RSC et des composants du kinétochore (Hsu and Laurent, 2002). Le complexe RSC a été localisé par immunoprécipitation de

chromatine au niveau des centromères et joue un rôle dans la séparation des chromosomes mitotiques (Hsu and Laurent, 2002). D'autre part, l'homologue humain de RSC, SWI/SNF-B, est localisé au niveau des kinétochores (Xue *et al.*, 2000). Ces données indiquent que le complexe RSC intervient dans le déroulement du cycle cellulaire. Cette fonction pourrait être directe par exemple sur la ségrégation des chromosomes et la structure du centromère et indirecte *via* la régulation de la transcription de gène contrôlant le cycle cellulaire.

IV.3. Les complexes de remodelage, une famille qui s'agrandit...

Les données de séquençage de nombreux organismes révèlent que la structure primaire de nombreuses protéines présente des ressemblances avec celle de l'ATPase Swi2/Snf2. Ces protéines sont autant d'ATPases potentielles. Tous les complexes de remodelage de la chromatine caractérisés à ce jour sont bâtis autour d'une sous-unité ATPase appartenant à la "super-famille" Swi2/Snf2. Ces différents complexes de remodelage sont classés en quatre groupes, SWI/SNF, ISWI, MI-2/CHD et INO80, en fonction de leur sous-unité catalytique. La figure 15 montre une représentation schématique des ATPases Swi2/Snf2, ISWI, Mi-2 et Ino80. Leur domaine ATPase est conservé et ressemble à celui d'ADN hélicases. Celui de la protéine Ino80 de *S. cerevisiae* a la particularité d'être divisé en deux sous-domaines. Aucune activité hélicase n'a été démontrée pour ces complexes de remodelage à l'exception du complexe de levure INO80 (Shen *et al.*, 2000). Le domaine ATPase est associé à un autre motif spécifique de chaque classe. Les ATPases de type Snf2/swi2 possèdent un motif de type bromodomaine. Le domaine ATPase des protéines homologues à Iswi est couplé à un module de liaison à l'ADN SANT. La famille Mi-2 est quant à elle caractérisée par la présence d'un chromodomaine. Les figures 16 à 19 présentent quelques complexes isolés chez la levure, la drosophile et l'homme. Le nombre de sous-unités de ces différents complexes varie énormément. Il est probable que plusieurs sous-unités servent de plate-forme d'interaction et soient impliquées dans

le ciblage de l'activité de ces complexes (Phelan *et al.*, 1999). Ces différents complexes ont des activités différentes et agissent vraisemblablement selon des modes différents.

IV.3.1. La famille SWI/SNF.

Le complexe SWI/SNF de la levure est le premier complexe d'une famille de facteurs contenant une ATPase de type à Swi2/Snf2 à avoir été isolé. Des complexes similaires ont été isolés de nombreux organismes. La famille SWI/SNF contient notamment les complexes de levure SWI/SNF, RSC et les différentes isoformes humaines de facteurs SWI/SNF-A et SWI/SNF-B. Les fonctions des complexes SWI/SNF et RSC ayant été abordées dans les paragraphes précédents, cette famille de complexe de ne sera pas détaillée davantage ici. Leur mécanisme d'action sera abordé dans le chapitre IV.4.

Chez les mammifères, ces complexes jouent un rôle majeur dans le contrôle de la structure chromatinienne. Ils sont nécessaires à la régulation du cycle cellulaire (Muchardt and Yaniv, 1999a, b). Le développement de plusieurs types de cancers sont liés à des dysfonctionnements de SWI/SNF (revue dans Muchardt and Yaniv, 1999a, b). Par exemple, la grande majorité des tumeurs rhabdoïdes, un des cancers pédiatriques les plus agressifs, est associée à des événements de délétion du gène *SNF5/INI1*, une des sous-unités des complexes SWI/SNF humains (Versteeg *et al.*, 1998 ; Roberts *et al.*, 2000).

IV.3.2. La famille ISWI.

La famille ISWI est caractérisée par la protéine de Iswi (**I**mitation **SWI**), isolée chez la drosophile. Cette protéine présente de forte similitude avec Swi2/Snf2 mais contient un motif de type SANT à la place du bromodomaine présent dans la protéine Swi2. Le motif SANT est un motif de liaison à l'ADN fréquemment trouvé dans des protéines liées à la chromatine (revue dans Aasland *et al.*, 1996). Le premier membre de cette famille est le complexe de drosophile NURF (**N**ucleosome **R**emodeling **F**actor). En plus de NURF, la famille ISWI contient entre autres les complexes de drosophile CHRAC (**C**Hromatin **R**emodeling and **A**ssembly **C**omplex) et ACF (**A**TP-utilizing **C**hromatin remodeling and assembly **F**actor), de levure ISW1

et ISW2, humains RSF (**R**emodeling and **S**pacing **F**actor), WCRF (**W**illiams syndrome transcription factor **C**hromatin **R**emodeling **F**actor), CHRAC et NoRC (**N**ucleolar **R**emodeling **C**omplex ; pour revue voir Langst and Becker, 2001).

Il est intéressant de noter la présence de la même ATPase dans plusieurs complexes de compositions différentes. Les protéines de levure Isw1 et Isw2 sont homologues. Ce sont les sous-unités ATPase respectivement des complexes ISW1 et ISW2 dont les fonctions sont différentes. En effet, des études indiquent que les complexes CHRAC, ACF, et ISW2 peuvent moduler l'espacement des nucléosomes *in vitro* (Tsukiyama and Wu, 1997 ; Varga-Weisz *et al.*, 1997) alors que les facteurs NURF et ISW1 ne le peuvent pas. Par ailleurs, la protéine Iswi, produite de manière recombinante, possède une activité intrinsèque de remodelage. *In vitro*, la protéine Iswi peut assembler des nucléosomes et catalyser le transfert d'un nucléosome du centre de la matrice vers son extrémité. Au sein de CHRAC, Iswi catalyse la réaction inverse en transférant les nucléosomes préférentiellement des extrémités vers le centre de la matrice (Langst *et al.*, 1999). Il a été démontré que la protéine Acf1 fait partie des complexes ACF et CHRAC. L'association des protéines Iswi et Acf1 a pour conséquence non seulement d'augmenter très fortement l'activité d'Iswi mais également de modifier ces propriétés intrinsèques de remodelage (Ito *et al.*, 1999 ; Eberhardter *et al.*, 2001). Ces données montrent donc que bien que tous ces complexes possèdent l'ATPase Iswi, leurs activités sont différentes et que l'activité d'Iswi est modulée par les autres protéines auxquelles elle s'associe. Une même ATPase peut donc catalyser des réactions différentes en fonction de la composition du complexe au sein duquel elle s'intègre.

Le complexe de mammifères NoRC (**N**ucleolar **R**emodeling **C**omplex) est apparemment un nouveau membre de la famille ISWI (Strohner *et al.*, 2001). La protéine Tip5 interagit avec hSnf2h, l'homologue humain de Iswi. Des expériences d'immunofluorescence montre que Tip5 est localisé dans le nucléole. Le complexe Tip5-Snf2h est capable *in vitro* de faire glisser des nucléosomes de manière ATP-dépendante. NoRC pourrait ainsi être un complexe de remodelage nucléolaire

impliqué dans la régulation de la structure chromatinienne du locus de l'ADN ribosomique.

IV.3.3. Type MI-2/CHD.

L'ATPase fondatrice de cette famille est la protéine humaine Mi-2 (Wade *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 1998). Cette protéine possède un chromodomaine et appartient au complexe NuRD (**N**ucleosome **R**emodeling and **D**eacetylating ; Tong *et al.*, 1998 ; Xue *et al.*, 1998). Comme cela a été observé pour d'autres complexes de remodelage, l'activité de l'ATPase est modulée par les autres protéines du complexe (Wang and Zhang, 2001). Notons que ce complexe a la particularité de posséder une activité de remodelage de la chromatine jumelée à une activité d'histone déacétylase. En effet, ce complexe contient les histone déacétylases Hdac1 et Hdac2.

La fonction des complexes de cette famille est encore mal comprise. Les complexes isolés de cellules de mammifères et de xénope contiennent aussi des ADN méthyltransférases putatives (Wade *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 1999). La présence d'histone déacétylases et d'ADN méthyltransférases dans ces complexes suggèrent qu'ils sont impliqués dans la répression transcriptionnelle. Toutefois, la protéine Chd1, un homologue de Mi-2 chez la drosophile, est localisée au niveau de la chromatine transcriptionnellement active, ce qui évoque un rôle positif dans la transcription pour cette protéine (Stokes *et al.*, 1996).

Chez *S. cerevisiae*, seul le polypeptide Chd1 appartient à la famille de protéines Mi-2. Il a été montré par puces à ADN, que Chd1 n'est requise pour la transcription que d'un petit nombre de gènes (Tran *et al.*, 2000). Il est possible que l'activité de Chd1 soit partiellement redondante avec d'autres complexes de remodelage déjà identifiés ou non. Par ailleurs, alors que les protéines de type Mi-2 des eucaryotes supérieurs sont assemblées dans des complexes et associées à des histone déacétylases, la protéine Chd1 de levure forme apparemment un homodimère. Aucune interaction physique ou génétique de Chd1 avec des histone déacétylases n'a été décrite à ce jour.

IV.3.4. Type INO80.

La protéine Ino80 représente un nouveau type d'ATPase. En effet, son domaine ATPase est éclaté en deux sous-domaines. L'aptitude du complexe INO80 à remodeler la structure de la chromatine a été démontrée *in vitro* (Shen *et al.*, 2000). Du point de vue transcriptionnel, le gène *INO80* a été isolé parce qu'il est nécessaire à la transcription du gène *INO1* en l'absence d'inositol (Ebbert *et al.*, 1999). Le complexe INO80 pourrait également intervenir dans la réparation de l'ADN. En effet, la protéine bactérienne RuvB est impliquée dans la réparation de l'ADN. La protéine Ino80 est copurifiée avec deux protéines homologues à cette ADN hélicase, Rvb1 et Rvb2. Cela pourrait expliquer l'activité ADN hélicase associée au complexe INO80 (Shen *et al.*, 2000). Une mutation dans le gène *INO80* entraîne une sensibilité accrue aux dommages à l'ADN (Shen *et al.*, 2000), ce qui suggère que le complexe INO80 pourrait participer aux mécanismes de réparation des dommages à l'ADN.

IV.4. Modes d'action possibles.

IV.4.1. Aspects mécanistiques.

D'un point de vue biochimique, les complexes SWI/SNF humains et de levure ainsi que RSC sont capables de se lier à de l'ADN nu ou nucléosomal sans hydrolyse d'ATP. Ces complexes modifient *in vitro* de manière ATP-dépendante la structure des nucléosomes (Côté *et al.*, 1994 ; Cairns *et al.*, 1996 ; Schnitzler *et al.*, 1998). L'activité ATP-dépendante est portée par la sous-unité de type Swi2/Snf2 et est stimulée par de l'ADN nu ou nucléosomal.

Les complexes SWI/SNF et RSC réalisent deux types de remodelage (figure 20). Ces deux complexes ont la possibilité de transférer *in vitro* le nucléosome d'une matrice mononucléosomale vers un brin d'ADN nu (déplacements en *trans* ; Lorch *et al.*, 1999 ; Whitehouse *et al.*, 1999). Des glissements de nucléosomes sur un même brin d'ADN (déplacements en *cis*) ont également été mis en évidence (Lorch *et al.*, 2001). L'équilibre entre déplacement en *cis* et *trans* est déterminé par la concentration locale

de SWI/SNF. Les déplacements en *cis* sont favorisés à basse concentration (Fryer and Archer, 1998 ; Whitehouse *et al.*, 1999).

Le deuxième type de remodelage consiste en la formation d'un nucléosome de conformation altérée dont le contenu en histone n'est pas modifié mais où les contacts histone-ADN sont perturbés. Ce remodelage se traduit expérimentalement par une sensibilité accrue de l'ADN à la digestion par des DNases. Un intermédiaire stable a pu être purifié. Il s'agit d'un dinucléosome non covalent, visualisé dans des expériences de retard sur gel sous la forme d'un complexe histone-ADN dont la mobilité par rapport au nucléosome standard est réduite sur gel. Cet intermédiaire activé est stable en l'absence d'ATP et du complexe. L'addition d'ATP et de l'enzyme permet de revenir à l'état standard (Phelan *et al.*, 2000 ; Lorch *et al.*, 2001). L'intermédiaire réactionnel peut également retourner dans son état initial en l'absence du complexe enzymatique mais de manière lente. Les complexes SWI/SNF et RSC catalysent des interconversions rapides entre ces différentes conformations de nucléosomes (figure 20 ; Narlikar *et al.*, 2001 et revue dans Narlikar *et al.*, 2002).

Le nombre de sous-unités des complexes de remodelage est variable mais l'ATPase est toujours associée à au moins une autre protéine. Dans le cas de SWI/SNF humain, il a été montré que la totalité des sous-unités n'est pas nécessaire pour que le complexe catalyse une réaction (Phelan *et al.*, 1999). L'activité des protéines Iswi et Mi-2 est modifiée en fonction des sous-unités auxquelles elles sont associées (Ito *et al.*, 1999 ; Eberhardter *et al.*, 2001 ; Wang and Zhang, 2001). Ceci suggère que ce complexe comporte un cœur catalytique formé de la sous-unité ATPase et de protéines qui régulent son activité ainsi qu'éventuellement une série de protéines qui permettent le ciblage du complexe.

Contrairement aux complexes de type SWI/SNF qui semblent avoir le même type d'activité, les complexes ISWI présentent des caractéristiques différentes. Ceci reflète probablement des différences dans leurs mécanismes d'action. Ces deux types de complexes n'ont pas la même spécificité de substrat. L'activité des complexes SWI/SNF et RSC humains et de levure est stimulée par de l'ADN nu ou de l'ADN nucléosomal (Laurent *et al.*, 1993 ; Lorch *et al.*, 1998 ; Phelan *et al.*, 1999). Par contre, le complexe NURF n'est activé que par de l'ADN nucléosomal et son activité, contrairement à celle de SWI/SNF, nécessite la présence des queues N-terminales des histones (Georgel *et al.*, 1997 ; Logie *et al.*, 1999). Le principal mécanisme d'action des complexes ISWI est probablement le glissement des nucléosomes. Cela semble faire intervenir un affaiblissement des contacts histones-ADN. Les nucléosomes remodelés par Iswi conservent les propriétés des nucléosomes "standards". Les complexes ISWI ne semblent pas générer, contrairement aux complexes SWI/SNF, des conformations altérées (revue dans Narlikar *et al.*, 2002).

Il a été proposé que la fonction des complexes de remodelage de la chromatine soit de catalyser des interconversions entre différents états possibles de la chromatine. Selon ce modèle, les complexes de remodelage n'assurent pas directement la formation d'un état "ouvert" ou d'un état "fermé". Les différentes protéines présentes au voisinage permettraient de fixer les nucléosomes dans une conformation donnée (voir (Kingston and Narlikar, 1999).

IV.4.2. Recrutements des machineries de remodelage.

B. Cairns a proposé quatre modèles différents de recrutement des activités de remodelage de la chromatine (Cairns, 1998). Ces modèles sont transposables dans le cas d'une répression de la transcription.

Dans le premier modèle, les activateurs de la transcription ne peuvent pas se fixer à leur séquence si l'affinité pour leur site de liaison est trop faible. Ces activateurs interagiraient avec les machineries de remodelage pour affaiblir les

contacts histones-ADN. Ceci permettrait la liaison de l'activateur sur son site. Ce modèle est concordant avec le fait que certains activateurs ont en effet la capacité de se fixer à leur site même sur des matrices nucléosomales ou si leur affinité pour leur site est forte (Burns and Peterson, 1997).

Dans le second modèle, le processus commence par la fixation de l'activateur sur son site, suivi du recrutement de l'activité de remodelage. Certains activateurs comme Gal4 sont capables de se fixer sur une matrice chromatinienne (Workman and Kingston, 1992). Le remodelage de la région promotrice permettrait le recrutement et d'autres facteurs et l'activation de la transcription.

Dans le troisième modèle, les facteurs de remodelage interviennent au hasard permettant de libérer aléatoirement les sites de liaison des activateurs et facteurs de transcription. Bien que possible, ce modèle implique néanmoins une forte dépense énergétique.

Dans le dernier modèle, l'action des machineries de remodelage est inhibée par la présence sur la matrice de répresseurs transcriptionnels. Une première étape de suppression de l'interaction entre le répresseur et les nucléosomes permet de libérer la matrice. Les machineries de remodelage interviennent alors et facilitent la liaison des facteurs de transcription.

Des arguments indiquent cependant que ces complexes n'agissent pas au hasard dans le génome, mais seraient bien ciblés vers des régions chromatiniennes particulières (revue dans Kingston and Narlikar, 1999). Ceci ne permet pas d'exclure un mode d'action aléatoire. Des interactions génétiques ou physiques entre des activateurs ou des répresseurs de la transcription et des complexes de remodelage ont été établies. Ceci va dans le sens d'un recrutement ciblé. Les complexes de remodelage pourraient alors exercer spécifiquement à certains loci des effets positifs ou négatifs sur la transcription. Un exemple est fourni par les protéines Hir1 et Hir2. Ces dernières sont impliquées dans l'extinction de la transcription des gènes

d'histone *HTA1* et *HTB1*. Ces deux gènes sont transcrits à partir d'un promoteur divergent. Les protéines Hir 1 et Hir2 se fixent sur le promoteur de ces gènes au niveau d'un site répresseur. Une co-immunoprécipitation entre Hir1 et Hir2 et trois protéines de SWI/SNF a été observée (Dimova *et al.*, 1999). Ces mêmes auteurs ont également montré par immunoprécipitation de chromatine que SWI/SNF est recruté par Hir1 et Hir2. La délétion des gènes correspondants entraîne une dérégulation de la transcription des gènes *HTA1* et *HTB1*. De même, lorsque le site de fixation des protéines Hir1 et Hir1 au promoteur est délété, SWI/SNF n'est plus nécessaire à l'activation de la transcription des gènes d'histones. Il semble que SWI/SNF soit nécessaire pour lever la répression imposée par Hir1 et Hir2 à ce locus. Plusieurs études montrent que RSC est également présent aux niveaux des promoteurs des gènes d'histones et qu'il participe à la régulation de la transcription de ces gènes d'histones (Damelin *et al.*, 2002 ; Ng *et al.*, 2002). De même que pour le complexe SWI/SNF, l'occupation du promoteur par RSC est dépendante de la présence des protéines Hir1 et Hir2 mais est négativement corrélée à l'activité transcriptionnelle (Ng *et al.*, 2002). Il semble donc que SWI/SNF et RSC aient des effets antagonistes au niveau du promoteur des gènes *HTA1/HTB1*. Ceci montre également que bien que présentant de nombreuses analogies, ces complexes ne sont pas redondants et assurent des fonctions bien distinctes.

Les études de transcription par puces à ADN montrent que le complexe SWI/SNF de levure interviennent dans la répression de la transcription (Holstege *et al.*, 1998 ; Sudarsanam *et al.*, 2000). De même, Les complexes SWI/SNF contenant l'ATPase Brg1 semblent impliqués dans la répression transcriptionnelle par la protéine Rb (pour revue, voir Zhang and Dean, 2001). Dans le cas des complexes de type ISWI, le recrutement du complexe ISW2 de levure par le répresseur transcriptionnel Ume6 a été démontré (Goldmark *et al.*, 2000). Le complexe histone déacétylase Sin3-Rpd3 interagit également avec la protéine Ume6 (Fazzio *et al.*, 2001).

L'holoenzyme pol II est un autre modèle permettant de rendre compte du ciblage des complexes de remodelage. Les activateurs spécifiques recruteraient la

forme holoenzyme de la pol II, entraînant avec elle les activités de remodelage nécessaires. Les complexes SWI/SNF humains et de levure ont été purifiés avec l'holoenzyme pol II (Wilson *et al.*, 1996 ; Cho *et al.*, 1998 ; Neish *et al.*, 1998). De même, des histone acétyltransférases ont été co-purifiées avec l'enzyme humaine (Cho *et al.*, 1998 ; Neish *et al.*, 1998). Cependant, d'autres purifications n'ont pas isolé ce type de complexe parmi les composants de l'holoenzyme (Cairns *et al.*, 1996), ce qui suggère que d'autres modes de recrutement doivent exister.

Ces complexes ne paraissent pas exercer d'effet sur de grands domaines chromatinien. Aucun argument en faveur d'un rôle global de SWI/SNF n'a été rapporté. Au contraire, il semble que l'intervention transcriptionnelle de SWI/SNF se fasse au niveau de gènes individuels et non sur des domaines chromosomiques (Holstege *et al.*, 1998 ; Sudarsanam *et al.*, 2000). Des expériences de colocalisation par immunofluorescence ne montrent pas de superposition étendue des signaux d'Iswi et de la pol II dans les cellules de glandes salivaires de larves de drosophile (Deuring *et al.*, 2000). Ceci suggère que les complexes ISWI n'interviennent que ponctuellement dans la transcription. Cependant, cela n'exclut pas que les effets du remodelage se répercutent sur de grands fragments. En effet, les complexes de remodelage de la famille ISWI pourraient également agir au niveau de grands domaines chromatinien voire au niveau de chromosomes complets. Ces facteurs sont impliqués *in vivo* dans la maintenance de structures d'ordre supérieur. En effet, des mutations dans l'ATPase Iswi provoquent chez la drosophile une très forte altération de la structure du chromosome X chez les mâles (Deuring *et al.*, 2000). Chez cette espèce, contrairement à ce qui se produit chez les mammifères, c'est le chromosome X du mâle qui fait l'objet de régulations liées au sexe. Ce chromosome est transcriptionnellement hyperactif de façon à rejoindre le taux de transcription observé chez la femelle. Un autre argument en faveur d'un rôle global des complexes de remodelage de la famille ISWI vient de l'étude des clonages par transplantation de noyau. Ce type de clonage fait apparaître de nombreuses modifications des noyaux des cellules somatiques implantés. La transplantation du noyau provoque une décondensation de la

chromatine et la dissociation de la TBP de l'ADN. Ces modifications permettent de "dédiérencier" le noyau et de retourner à un état basal de transcription. Cette dédifférenciation peut être reproduite *in vitro*. Kikyo et collaborateurs ont montré que cet effet requiert la présence d'ATP et fait intervenir un complexe contenant la protéine ISWI (Kikyo *et al.*, 2000).

IV.5. Modifications covalentes et remodelage, des mécanismes interdépendants.

Les mécanismes de modifications covalentes des histones et de remodelage de des nucléosomes ne sont pas indépendants. Une des implications de la théorie du code des histones est que ces différentes machineries peuvent s'influencer mutuellement. L'action des complexes de modification des histones et de remodelage de la chromatine peut être ciblée au niveau de certains promoteurs. Certains régulateurs transcriptionnels interagissent avec les deux types de machineries, ce qui suggère que les deux mécanismes peuvent coopérer (Cosma *et al.*, 1999 ; Agalioti *et al.*, 2000 ; Fazzio *et al.*, 2001 ; Reinke *et al.*, 2001). Chez la levure, la double délétion des gènes *SWI2* et *GCN5* fait apparaître des défauts transcriptionnels additifs par rapport aux simples délétants (Biggar and Crabtree, 1999 ; Sudarsanam *et al.*, 1999). Cela suggère l'existence de fonctions redondantes. Des études ont été publiées sur la séquence d'arrivée sur un promoteur des machineries de remodelage et de transcription. Elles montrent que ces modifications covalentes et le remodelage des nucléosomes peuvent s'effectuer de manière synergique et coordonnée. Toutefois, il ne semble pas y avoir d'ordre systématique de recrutement (Cosma *et al.*, 1999 ; Dilworth *et al.*, 1999 ; Krebs *et al.*, 1999 ; Agalioti *et al.*, 2000 ; Dilworth *et al.*, 2000 ; Syntichaki *et al.*, 2000 ; Reinke *et al.*, 2001 ; Soutoglou and Talianidis, 2002 ; revue dans Cosma, 2002). Les exemples du gène de l'endonucléase *HO* et de l'interféron- β sont développés à titre d'exemple.

Le promoteur le mieux étudié est celui du gène de l'endonucléase *HO* chez *S. cerevisiae* (Cosma *et al.*, 1999 ; Krebs *et al.*, 1999 ; Urnov and Wolffe, 2001). En utilisant des méthodes génétiques et biochimiques d'immunoprécipitation de chromatine, Cosma *et al.* (1999) et Krebs *et al.* (1999) ont disséqué les événements successifs survenant au niveau de ce promoteur au cours du cycle cellulaire. Le promoteur est constitué de deux régions régulatrices URS1 et URS2 et de la boîte TATA. Le site URS1 contient deux sites de fixation du régulateur Swi5. La région URS2 comprend une dizaine de sites de liaison de l'activateur SBF (hétérodimère Swi4/Swi6). Les différentes étapes d'activation du gène sont schématisées sur la figure 21. Cette séquence décrit l'ordre d'arrivée des différents complexes sur le promoteur mais ne permet pas d'affirmer que cet ordre soit aussi l'ordre d'action de ces différents complexes. Le gène *HO* est transcrit transitoirement en fin de phase G1 dans la cellule mère mais n'est jamais transcrit dans la cellule fille. Les cellules mères changent de type sexuel à chaque cycle tandis que les cellules filles gardent le type sexuel de la spore initiale. A la fin de la phase G1, la déphosphorylation de l'activateur Swi5 provoque sa relocalisation massive et rapide du cytoplasme vers le noyau. Cette translocation survient en même temps que l'arrêt de la transcription du gène *SWI5* ainsi qu'une dégradation rapide des protéines Swi5 présentes. Néanmoins la présence transitoire de la protéine Swi5 permet l'activation de la transcription de certains gènes dont *ASH1*. Ce répresseur s'accumule spécifiquement dans la cellule fille et bloque la transcription du gène *HO* en se fixant sur son promoteur et en empêchant le recrutement de différentes activités.

Dans la cellule mère, le régulateur Swi5 se fixe sur ses sites, accessibles malgré la présence de nucléosomes. Il n'y reste que 5 minutes après lesquelles il est rapidement dégradé. Le complexe SWI/SNF est immédiatement recruté sur le promoteur par Swi5. Cela s'accompagne d'un remodelage de la structure de la chromatine comme le montre le changement du profil de digestion à la DNaseI. Le régulateur Swi5 quitte rapidement le promoteur, mais SWI/SNF y reste accroché. Le complexe SAGA est ciblé vers le promoteur, immédiatement suivi par l'activateur

SBF. Toutefois, la présence continue d'un activateur est nécessaire pour que le complexe SWI/SNF soit maintenu sur le promoteur (Hassan *et al.*, 2001). D'autre part, le maintien du complexe est nécessaire pour maintenir le taux de transcription du gène *SUC2* (Sudarsanam *et al.*, 1999). L'acétylation des nucléosomes du promoteur stabilise la liaison du complexe SWI/SNF (Syntichaki *et al.*, 2000 ; Hassan *et al.*, 2001). Le recrutement rapide du complexe SAGA permet d'expliquer que SWI/SNF occupe le promoteur même après le départ du régulateur Swi5. Syntichaki et collaborateurs ont montré sur un gène chimérique que le bromodomaine de l'histone acétyltransférase Gcn5 n'est pas nécessaire à l'activité de la protéine. Cependant, la délétion ou des mutations dans ce bromodomaine abolit le remodelage du promoteur de gène chimérique par le complexe SWI/SNF (Syntichaki *et al.*, 2000). Ces auteurs ont proposé que SWI/SNF peut se fixer au promoteur en l'absence de Gcn5. Les acétylations des histones par Gcn5 pourraient interférer avec la liaison de SWI/SNF au promoteur. En présence de Gcn5, le bromodomaine de la protéine serait nécessaire pour stabiliser l'interaction de SWI/SNF avec le promoteur en régulant le profil d'acétylation ou en bloquant les effets des acétylations sur le complexe SWI/SNF. Par ailleurs, l'acétylation de la matrice pourrait limiter l'action des complexes de remodelage. En effet, l'activité de RSC et SWI/SNF sur des matrices mononucléosomales hyperacétylées est partiellement inhibée *in vitro* (Logie *et al.*, 1999).

Les recrutements des complexes SAGA et de SBF interviennent dans une fenêtre de temps réduite. Ils ne peuvent pas être ordonnés par immunoprécipitation de chromatine. Le complexe SAGA est probablement recruté en premier. En effet, des expériences de génétique indiquent que le recrutement de SAGA est nécessaire à celui du dimère SBF. Une région d'environ 1kb, contenant la boîte TATA et les sites de liaison de l'activateur SBF, est acétylée. Une vague de progression de l'acétylation est observée, ce qui fait émettre l'hypothèse d'un déplacement de l'activité HAT sur plusieurs nucléosomes en direction de la boîte TATA. L'étendue de la zone acétylée est déterminée par l'histone déacétylase Sin3/Rpd3 (Krebs *et al.*, 1999). Une fois que

l'activateur SBF est fixé sur le promoteur remodelé et acétylé, la transcription du gène *HO* est activée.

L'étude de la cinétique d'activation du gène de l'endonucléase *HO* a permis d'établir l'existence d'un recrutement séquentiel et coordonné de plusieurs activités de remodelage de la chromatine. Cet ordre n'est pas absolu. Une étude similaire a été menée sur la séquence d'activation du gène de l'interféron- β (INF- β) humain en réponse à une infection virale. Agalioti *et al.* (2000) ont utilisé des expériences d'immunoprécipitation de chromatine, d'accessibilité aux enzymes de restriction ainsi qu'une reconstitution *in vitro* pour déterminer l'ordre d'arrivée des différents facteurs (figure 22 ; Agalioti *et al.*, 2000). L'activation de la transcription du gène de l'INF- β débute par la liaison sur le promoteur d'un complexe, dit "enhanceosome", comprenant plusieurs facteurs de transcription et une protéine se fixant à l'ADN HMG I(Y). La fixation de l'enhanceosome provoque le remodelage de la structure du promoteur localement par éviction d'un octamère d'histone qui masque la boîte TATA et le point d'initiation de la transcription. Le complexe HAT GCN5 est alors recruté puis libéré du promoteur. L'histone acétyltransférase Cbp est alors ciblée sur le promoteur en même temps que l'ARN polymérase II. Le complexe SWI/SNF est ensuite recruté sur le promoteur. Enfin, le facteur général TFIID se fixe à l'ADN et complète le complexe de transcription. L'ordre de recrutement des différentes activités est donc totalement différent dans ces deux exemples. Des études *in vivo* et *in vitro* sur d'autres promoteurs ont permis la construction d'autres modèles séquentiels différents (Dilworth *et al.*, 2000 ; Reinke *et al.*, 2001 ; Soutoglou and Talianidis, 2002).

Les différences observées en termes d'ordre d'arrivée et de cinétique pourraient venir soit du système de reconstitution utilisé soit plus vraisemblablement refléter des différences intrinsèques aux promoteurs. Ceci montre que même si l'ordre de recrutement n'est pas prévisible a priori, les différentes activités de remaniements de la chromatine sont en relation les unes avec les autres et s'influencent mutuellement.

Pour conclure cette introduction, j'aimerais reprendre quelques uns des points importants. La transcription est un phénomène clé de la vie cellulaire. Son bon déroulement est absolument nécessaire au fonctionnement de la cellule. Dans cette introduction, je me suis efforcée de montrer que la transcription chez les eucaryotes est un phénomène complexe régulé à plusieurs niveaux. La transcription s'effectue dans un complexe chromatinien. La chromatine, tout en structurant le génome, constitue un obstacle pour la transcription. Cette structure limite l'accès de l'ADN aux machineries de transcription et peut en freiner la progression. Le remodelage de la chromatine permet d'accroître ou de réduire l'accessibilité de l'ADN et ainsi de permettre ou non la transcription d'un gène. La modulation de la structure chromatinienne est donc un puissant moyen de régulation de transcription. Les deux grands modes de remodelage de la chromatine ont été abordés dans cette introduction. Les appareils de transcription font appel à ces deux modes de remodelage lors de l'initiation mais aussi de l'élongation de la transcription. Le nombre de ces facteurs ne cesse d'augmenter, ce qui souligne l'importance de ces facteurs dans la régulation transcriptionnelle. Ces deux grandes familles ne sont pas indépendantes. Au contraire, il apparaît clairement que ces processus s'imbriquent.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à deux sujets différents avec comme point commun la protéine ABC27, partagée par les trois ARN polymérases et dont la fonction est encore mal connue. La sous-unité ABC27 est constituée de deux domaines distincts. Le domaine carboxy-terminal, présent chez les archéobactéries, est impliqué dans l'ancrage de la sous-unité dans l'ARN polymérase. La partie amino-terminale, spécifique des eucaryotes, semble impliquée dans des interactions avec des facteurs de transcription et des activateurs transcriptionnels. La première partie de ma thèse a consisté à poursuivre le travail entamé au cours de mon DEA. Notre but était d'étudier la fonction de l'interaction entre les sous-unités ABC27 et C160 dans l'ARN polymérase III et de rechercher des fonctions pour la protéine ABC27. Ce travail a consisté à rechercher des mutants de la grande sous-unité C160

affectant l'interaction ABC27. Le premier chapitre de la partie résultats est consacré à la mutagenèse de C160. N'ayant obtenu que très peu de résultats supplémentaires par rapport à mon DEA, ces résultats seront exposés brièvement et ne seront plus discutés dans la partie perspectives. La poursuite de cette étude risquait de ne pas donner de résultats dans un délais raisonnable, nous avons choisi de débiter une nouvelle étude sur le complexe RSC.

Avant mon arrivée au laboratoire, des interactions liant le complexe de remodelage RSC et les trois ARN polymérases ont été découvertes par la méthode du double-hybride. Ce complexe appartient à la famille des complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF. Toutefois, le complexe RSC, contrairement à SWI/SNF, est essentiel à la viabilité cellulaire. Le complexe RSC est abondant dans la cellule et il semble qu'il ait des fonctions pleiotropes. Ces interactions double-hybride suggéraient que le complexe RSC pourrait avoir un large spectre et intervenir dans les trois systèmes de transcription. Ceci pourrait être une particularité du complexe RSC. En effet, il n'a pas été montré à ce jour d'interaction entre un complexe de remodelage et les trois ARN polymérases. Il m'a été proposé d'étudier, du point de vue transcriptionnel, un mutant de la sous-unité Rsc4 du complexe RSC.

Étude de la fonction de l'interaction entre la sous-unité commune ABC27 et la grande sous-unité de l'ARN polymérase III.

Les trois ARN polymérases de *S. cerevisiae*. partagent 5 sous-unités parmi lesquelles ABC27 dont la fonction n'est pas encore bien établie. Des cribles double-hybride sur les sous-unités d'ARN polymérases ont été réalisés au laboratoire dans le cadre du projet TAPIR (Two-hybrid Analysis of Proteins Involved in RNA metabolism) dans le but de chercher un réseau d'interaction et d'intégrer la transcription dans le métabolisme nucléaire (Flores *et al.*, 1999). La technique du double-hybride permet de détecter des interactions protéiques. Elle est fondée sur la reconstitution d'un activateur transcriptionnel chimérique. De nombreux activateurs transcriptionnels, comme par exemple la protéine Gal4, peuvent être séparés en deux domaines distincts : un domaine de liaison à l'ADN et un domaine activateur de la transcription. Ces deux domaines séparés ne sont pas capables d'interagir et de d'activer la transcription. Les protéines "appâts" sont fusionnées au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 et les protéines "proies" au domaine activateur de Gal4. Si les protéines "appâts" et "proies" interagissent, l'interaction permet de rapprocher les deux domaines de la protéine Gal4 et de reconstituer un activateur transcriptionnel fonctionnel. L'interaction est testée dans la souche de levure Y190 dans laquelle le gène *GAL4* est inactivé. Le gène bactérien *LacZ* encodant la β -galactosidase, utilisé comme gène rapporteur, est placé sous le contrôle d'éléments promoteurs dépendants de l'activateur Gal4 (Fields and Song, 1989). La transcription du gène rapporteur est activée s'il y a interaction entre l'appât et la proie. Le X-gal est un substrat chromogène de la β -galactosidase qui permet de détecter la présence de l'enzyme par coloration en bleu des colonies.

Dans le cadre du programme TAPIR, des sous-unités d'ARN polymérases et de facteurs de transcription ont servi d'appâts. Les proies ont été sélectionnées dans une banque de fragments génomiques de *S. cerevisiae* (Fromont-Racine *et al.*, 1997). En

utilisant la sous-unité ABC27 comme appât, plusieurs fragments des sous-unités de type β' des trois ARN polymérases ont été identifiés (figure 5). Au total, 12 fragments de A190 (dont 10 indépendants), 2 (identiques) de B220 et enfin 7 (dont 6 indépendants) de C160 ont été isolés. Le recouplement de ces différents clones a permis de définir une région d'interaction, commune aux trois grandes sous-unités. Cette région englobe partiellement le domaine **h** (figures 5 et 6). Elle s'étend sur 73 acides aminés (1496 à 1576) dans A190, 236 dans B220 (1169 à 1406) et 108 dans C160 (1274 à 1381). L'alignement des séquences des grandes sous-unités d'ARN polymérases eucaryotes, archéobactériennes et eubactériennes montre une conservation de ce domaine chez les eucaryotes et les archéobactéries. En revanche, cette région n'existe pas chez les eubactéries, ce qui concorde avec la présence d'une sous-unité de type ABC27 chez les archéobactéries et son absence chez les eubactéries. La structure cristallographique de la pol II fait apparaître deux domaines de B220, que j'appellerai domaines 1 et 2, impliqués dans l'interaction avec ABC27. Ils sont compris dans les acides aminés 845-870 et 1275-1370 de B220 (Cramer *et al.*, 2000 ; Cramer *et al.*, 2001). La région d'interaction définie par la méthode du double hybride se superpose avec le deuxième domaine mais est plus étendue.

Deux approches sont possibles pour étudier la fonction de la sous-unité ABC27 et de son interaction avec les grandes sous-unités. La mutagénèse de résidus conservés d'ABC27 et son effet sur l'interaction a été réalisée au laboratoire par F. Navarro. Un petit nombre de d'acides aminés déterminants pour l'interaction a été identifié. D'autre part, la sous-unité ABC27 ne semble pas être impliquée dans l'activité. Aucune des mutations caractérisées n'a d'effet notable cette activité des ARN polymérases (F. Navarro et P. Thuriaux, manuscrit en préparation). Nous avons choisi une approche complémentaire qui consistait à rechercher des mutants thermosensibles dans la région d'interaction de la grande sous-unité C160 de l'ARN polymérase III. La transcription par l'ARN polymérase III est la mieux caractérisée du point de vue biochimique. D'autre part, la protéine ABC27 appartenant aux trois

ARN polymérase, cette approche nous affranchissait des effets pleiotropes que peuvent avoir des mutations dans cette sous-unité.

I. Mutagenèse

La figure 23 résume les principales étapes de la mutagenèse et du crible de sélection des mutants. La région mutagenisée comprend la région minimale d'interaction flanquée de chaque côté d'environ 100 pb. La mutagenèse a été faite par PCR en utilisant le taux d'erreur spontanée de l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (Taq polymérase) et sans augmenter ce taux d'erreur en ajoutant du manganèse dans la réaction de PCR, afin de limiter la fréquence des substitutions multiples. Les mutants ont été construits dans la souche MW636 dans laquelle le gène *RPC160* est inactivé et complétée par un plasmide centromérique portant le gène *RPC160* sous le contrôle de son propre promoteur (pC160-6 (*CEN4 URA3 RPC160*)). Les allèles mutants ont été générés par un double événement de recombinaison *in vivo* entre le fragment PCR et l'allèle *rpc160-240* (sur le plasmide pC160-240 (*CEN4 TRP1 rpc160-240*)). Cet allèle du gène *RPC160* porte 3 répétitions de la séquence encodant l'étiquette de l'hémagglutinine HA entre les deux premiers codons. Il est fonctionnel à 30°C mais responsable d'un retard de croissance à 37°C (figure 25). Nous nous sommes rendu compte de ce défaut de croissance *a posteriori* et son observation pourrait dépendre de légère variation de la température d'incubation. Les nouveaux allèles fonctionnels à 30°C ont été sélectionnés par échange de plasmide sur un milieu contenant de l'acide 5-fluoro-orotique (5-FOA ; Boeke *et al.*, 1984). Les cellules possédant un gène *URA3* sauvage convertissent le 5-FOA en un analogue toxique, le fluoro-uracile. Par conséquent, l'allèle sauvage *RPC160* ne peut être chassé que si l'allèle muté est fonctionnel. Nous avons ensuite recherché par réplique des clones thermosensibles à 37°C et en avons extrait les plasmides. Ceux-ci ont été utilisés pour transformer une seconde fois la souche MW636 afin de s'assurer que la thermosensibilité est liée à l'allèle mutant.

Sur environ 4500 transformants criblés, 12 mutations thermosensibles, toutes récessives, ont été identifiées (figures 24 et 25 ; tableau IV). Notre crible n'a par contre, pas permis d'isoler de mutant cryosensible. On peut penser que si ces mutations affectent l'interaction entre C160 et ABC27, la surexpression d'ABC27

permet de corriger les défauts. Mais, la recherche de suppression par surexpression de la sous-unité ABC27 n'a pas été concluante.

II. Interactions double-hybride et stabilité des enzymes mutantes

Nous avons utilisé la méthode du double-hybride afin d'évaluer l'effet des mutations introduites dans la grande sous-unité C160 sur son interaction avec ABC27. Pour cela, un fragment contenant la région d'interaction mutagénisée a été fusionné au domaine activateur de la protéine Gal4. L'interaction a été testée contre la protéine ABC27 fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de Gal4. Les différentes mutations ont des effets variables sur l'interaction (tableau IV). Parmi les mutations testées par double-hybride, 3 (A1266V, M1304V et D1307E) provoquent une légère baisse de l'interaction. Curieusement, la mutation M1260I Q1385L l'augmente visiblement. Les autres mutations ne modifient pas significativement l'intensité de la coloration, ce qui suggère que ces mutations n'affectent pas l'interaction entre les deux partenaires.

La déstabilisation de l'interaction ABC27•C160 est susceptible d'affecter la stabilité et de modifier la composition sous-unitaire des enzymes mutantes. Des observations similaires ont été faites pour un mutant du domaine **a** de la grande sous-unité C160. Cette mutation provoque la dissociation simultanée d'un sous-complexe constitué des sous-unités spécifiques de la pol III C82-C34-C31 (Werner *et al.*, 1992 ; Werner *et al.*, 1993). Notons toutefois que seules des interactions double-hybride entre ABC27 et les grandes sous-unités de type β ont été détectées et que la structure l'ARN polymérase II ne montre pas la présence d'un sous-complexe autour d'ABC27 (Flores *et al.*, 1999 ; Cramer *et al.*, 2001). Il est alors probable que la dissociation d'ABC27 n'entraînerait pas la perte d'autres sous-unités dans l'enzyme. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé des immunoprécipitations de l'ARN polymérase III à l'aide des étiquettes HA placées en position N-terminale de C160

(Dieci *et al.*, 1995). La stabilité thermique de l'enzyme a été testée par chauffage des extraits protéiques pendant 40 minutes à 45°C. Ces expériences ont été réalisées sur 6

mutants (A1266V, D1255G, Y1333C, M1403I, M1260I Q1385L, D1288G V1319A) parmi ceux présentant les plus importants défauts de croissance à 37°C. Tous les phénotypes possibles sur l'interaction double-hybride sont représentés (tableau IV). Les immunoprécipitations n'ont pas permis de mettre en évidence de variation dans la quantité d'ABC27 présente. De même le chauffage des extraits n'a dans aucun cas provoqué le détachement d'ABC27 de l'ARN polymérase et ce, quel que soit l'effet de la mutation sur l'interaction double-hybride avec C160. Les mutations que nous avons testées ne suffisent pas à provoquer la dissociation de la sous-unité ABC27 et les ARN polymérases préassemblées sont stables. Il est possible que ces mutations affectent l'assemblage des ARN polymérases à température restrictive. Cette possibilité n'a pas été testée.

III. Discussion

Nous avons recherché par mutagenèse aléatoire des mutants de la région d'interaction de la grande sous-unité de l'ARN polymérase III avec la sous-unité commune ABC27. Cette étude avait pour but de rechercher des résidus de C160 important pour l'interaction des deux sous-unités et d'étudier les conséquences de la dissociation de la sous-unité ABC27. Nous n'avons malheureusement pas caractérisé de mutations avec un phénotype marqué et provoquant une instabilité thermique de l'enzyme. L'étude que nous avons entamée n'a donc pas permis de fournir des renseignements supplémentaires sur la fonction de la sous-unité ABC27.

La parution de la structure tridimensionnelle de l'ARN polymérase III de *S. cerevisiae* a marqué un tournant décisif dans l'étude des ARN polymérases. Les alignements de séquences nous permettent de proposer une équivalence dans B220 des mutations que nous avons créées dans C160 (tableau IV ; figure 26). Toutefois, compte tenu de la faible conservation de la partie amino-terminale du domaine d'interaction, il est impossible d'aligner précisément les séquences dans cette région. Cet alignement a été fait de manière à n'introduire qu'un grand espace dans la

séquence de C160 en amont du domaine minimal d'interaction (figures 6 et 24). Les équivalences proposées sont donc spéculatives. En revanche, la région carboxy-terminale est bien conservée ce qui nous permet de positionner les mutations avec plus de certitude.

D'après Cramer *et al.* (2001), les hélices numérotées 45 et 46 constituent un point de contact entre les deux sous-unités. Ces hélices sont constituées de la séquence, extrêmement conservée, VLGIEAARAALYKEV. F. Navarro a isolé au laboratoire des mutations dans la sous-unité ABC27 provoquant la perte de son interaction double-hybride avec les grandes sous-unités. Le positionnement de ces mutations dans la structure tridimensionnelle de l'enzyme montre qu'ils font face à ces deux hélices. Ces données les désignent donc une des zones critiques pour l'interaction des deux protéines. Nous n'avons pas isolé de mutation dans le sommet de ces hélices. Seuls deux des différents acides aminés mutés (localisés dans l'hélice 46) sont à une distance inférieure à 6 Å de la sous-unité ABC27 (A1346 et A1347 dans B220 ; figure 26). La mutation Y1333C (A1346 dans B220) n'affecte pas l'interaction double-hybride. Quant à la deuxième, S1334G (A1347 dans B220), elle est associée à la substitution F1374I dans le mutant que nous avons isolé. La conjonction de ces deux mutations conduit à une augmentation de l'interaction double-hybride. Ne les ayant pas séparées, nous ne pouvons pas conclure si seule l'une d'elles est responsable de ce phénotype. Les résidus qui sont situés au delà de 6 Å sont probablement trop éloignés pour participer directement à l'interaction.

Notre crible n'a pas été exhaustif puisque nous n'avons pas trouvé deux fois la même mutation. Ceci pourrait expliquer que nous n'ayons pas obtenus de mutations dans les résidus mentionnés précédemment. Cependant la forte conservation de ces acides aminés et les données de F. Navarro laissent supposer que ces résidus sont importants pour l'interaction. Il est possible que la mutagénèse de ces acides aminés ne soit pas viable, même à 30°C. Le schéma du crible de sélection que nous avons fait indique que si de telles mutations ont été créées, elles ont été éliminées lors de l'étape d'échange de plasmide. Il serait donc intéressant, à la lumière de la structure

tridimensionnelle de l'enzyme, de reprendre cette étude et de réaliser la mutagenèse de ces acides aminés. Ceci permettrait peut-être d'obtenir des mutants perdant nettement l'interaction et ainsi de compléter l'étude du rôle de la sous-unité ABC27. D'autre part, Cramer *et al.* (2001) définissent deux zones de contact entre B220 et ABC27, ce qui pourrait permettre de fortement ancrer ABC27 dans l'enzyme. On peut alors penser que la conjugaison de mutations dans chacun de ces domaines est nécessaire pour provoquer la dissociation de la sous-unité.

Étude d'un mutant du complexe RSC chez S. cerevisiae.

Des cribles utilisant la méthode du double-hybride ont été réalisés au laboratoire sur des sous-unités d'ARN polymérases et de facteurs de transcription dans le cadre du projet TAPIR (Two-hybrid Analysis of Proteins Involved in RNA metabolism ; Fromont-Racine *et al.*, 1997 ; Flores *et al.*, 1999). Plusieurs fragments de sous-unités du complexe RSC ont été sélectionnés dans la banque de fragments génomiques (figure 27 ; A. Flores-Diaz, C. Boschiero, H. Dumay et M. Werner données non publiées). Deux fragments chevauchants carboxy-terminaux (acides aminés 533 à 625 et 558 à 625) de la protéine Rsc4 interagissent avec la sous-unité commune d'ARN polymérases ABC27. La sous-unité commune ABC10 β interagit avec Rsc1 et la sous-unité spécifique C11 de la pol III avec Rsc58, et la sous-unité Tfc4 (τ 131) du facteur de transcription TFIIC avec les protéines Rsc2 et Sth1.

Le principal écueil lié la technique du double-hybride tient à l'interprétation des données d'interactions. Même si une interaction est réelle, elle n'a pas nécessairement de sens physiologique et il convient donc de prendre d'autres critères en compte comme la localisation cellulaire ou les fonctions des protéines. On ne peut pas non plus exclure que l'interaction de deux protéines se fasse via un partenaire commun. D'autre part, l'expression des protéines sous forme de protéines de fusion peut générer des artéfacts. Enfin, certaines protéines dites "collantes" sont retrouvées fréquemment dans des cribles indépendants et sont éliminées de l'analyse. Les protéines qui ont une affinité pour l'ADN sont également susceptibles d'être sélectionnées en activant la transcription des gènes rapporteurs même en l'absence d'une protéine partenaire. Il convient donc de s'assurer que les partenaires d'interaction ne sont pas autoactivateurs et de confirmer les interactions double-hybride par une autre méthode. Aucun des fragments de sous-unités de RSC présentés sur la figure 28 n'est autoactivateur et n'a été retrouvé à plusieurs reprises

dans les cribles, ce qui indique que l'activation des gènes rapporteurs est bien due à une interaction entre ces deux fragments protéiques. Toutefois, l'existence de ces interactions double-hybride ne préjuge pas de leur signification biologique.

Le complexe RSC appartient à la famille SWI/SNF de complexes de remodelage de la chromatine qui participent à la régulation de la transcription en modulant l'accessibilité de l'ADN à la machinerie de transcription. Ce complexe a la particularité d'être essentiel à la viabilité cellulaire et est au moins dix fois plus abondant que SWI/SNF dans la cellule. Les interactions double-hybride découvertes au laboratoire nous ont conduits à proposer que RSC intervient pour réguler la transcription chez la levure. Mais l'existence d'interactions avec des sous-unités communes d'ARN polymérases (ABC27 et ABC10 β) soulève une question sur la spécificité de ces interactions. RSC intervient-il ou non dans la transcription ? Si oui, dans quel(s) système(s). Enfin, les interactions engagées par la sous-unité τ 131 du facteur de transcription TFIIC suggèrent que RSC pourrait intervenir au niveau du promoteur dans les premières phases de la transcription et en cours d'élongation.

I. Les interactions des ARN polymérases avec le complexe RSC

Afin de confirmer l'existence des interactions entre le complexe RSC et les ARN polymérases et répondre à la question de leur spécificité, j'ai réalisé des immunoprécipitations des ARN polymérases. Ne disposant pas alors d'anticorps dirigés contre les sous-unités de RSC, nous avons construit différentes souches dans lesquelles les protéines Rsc1 ou Rsc4 ont été étiquetées en position C-terminale par 13 répétitions de l'épitope Myc (Longtine *et al.*, 1998). Les différents allèles étiquetés sont placés soit au locus chromosomique soit sur un plasmide centromérique sous le contrôle de leur promoteur naturel. Il n'y a donc pas de surexpression des protéines qui pourraient "forcer" la co-immunoprécipitation.

Les protéines C11 et τ 131 appartiennent au système de transcription par l'ARN polymérase III. On peut donc se demander si RSC intervient spécifiquement dans la transcription par la pol III. Dans un premier temps, nous nous sommes donc consacrés à l'étude des interactions entre le complexe RSC et l'ARN polymérase III. L'immunoprécipitation de l'ARN polymérase III a été faite à partir de souches dérivées de la souche MW671 (*rpc160-Δ::HIS3 pC160-240 (CEN3 URA3 rpc160-240)* ; Dieci *et al.*, 1995) décrite dans le chapitre sur l'interaction de C160 avec ABC27. L'immunoprécipitation a été faite à l'aide d'anticorps dirigés contre l'épitope HA (12CA5) fixés sur des billes magnétiques. L'analyse en western blot des protéines éluées révèle que la protéine Rsc4 est co-immunoprécipitée avec la pol III. Aucun signal n'est détecté à partir de la souche contrôle dans laquelle seule la protéine Rsc4 est étiquetée (figure 28 D). Des résultats similaires ont été obtenus avec la sous-unité Rsc1 (A. Flores-Diaz, communication personnelle).

Le complexe RSC et les ARN polymérases agissent sur de l'ADN nucléosomal. Il est possible que la co-immunoprécipitation de RSC avec l'ARN polymérase III résulte de l'attachement des deux complexes à de l'ADN et non d'une interaction directe. Pour écarter cette hypothèse, j'ai réalisé une digestion à la DNase I sur les protéines retenues par les billes magnétiques. La co-immunoprécipitation de la protéine Rsc4 avec la pol III n'est pas affectée par ce traitement (résultat non présenté).

Les interactions avec les sous-unités communes nous ont conduits à nous intéresser aux liens entre les ARN polymérases I et II et le complexe RSC. Des expériences similaires à celles qui ont été réalisées sur la pol III nous ont permis de montrer que RSC est également co-immunoprécipité avec la pol I (figure 28 B). Le contrôle de digestion à la DNase n'a pas été réalisé mais on peut émettre l'hypothèse que le résultat obtenu sur la pol III peut être extrapolé.

L'immunoprécipitation de la pol II a été faite à partir de la souche Z242 dans laquelle la sous-unité B44.5 est étiquetée avec 3 épitopes HA du côté amino-terminal (Kolodziej *et al.*, 1990). Nous observons également observé une immunoprécipitation de la protéine Rsc1 avec la pol II. Toutefois, un signal est visible, mais plus faible, même en l'absence d'épitopes HA sur la sous-unité B44.5, (figure 28 C). Ce signal résulte d'une fixation non spécifique de la protéine Rsc1 aux billes magnétiques et ne nous permet pas de conclure sans ambiguïté à une immunoprécipitation du complexe RSC avec l'ARN polymérase II.

Nous avons montré que des sous-unités du complexe RSC peuvent être co-immunoprécipitées *in vitro* avec deux des trois ARN polymérases. Nous ne pouvons pas conclure formellement dans le cas de la pol II. Des liens entre machineries de transcription et de remodelage de la chromatine ont déjà été établis, mais aucune interaction d'un de ces complexes de remodelage avec les ARN polymérases I et III n'a été décrite.

L'ajout des épitopes Myc à l'extrémité C-terminale de la protéine Rsc4 provoque la perte de l'interaction double-hybride avec ABC27. Les interactions double-hybride n'ont pas pu être testées avec les protéines entières. En effet, la protéine Rsc4, fusionnée au domaine activateur de Gal4, ne donne aucun signal en double-hybride avec ABC27. Par contre, les 68 résidus C-terminaux de Rsc4 interagissent fortement en double-hybride avec ABC27 (figures 27 et 29). L'addition de ces épitopes Myc au fragment 558-625 de la protéine Rsc4 entraîne la perte de l'interaction (figure 29). La construction chimérique Gal4^{AD}-Rsc4(558-625)-13Myc est exprimée mais il est possible que cette chimère adopte une conformation non compatible avec une interaction en double-hybride. Même si les deux protéines n'interagissent plus apparemment en double-hybride, la protéine Rsc4 est immunoprécipitée avec les ARN polymérases. Ceci indique que la perte d'interaction n'est pas totale *in vivo*, ou

que les deux complexes interagissent via d'autres sous-unités, ce que suggèrent les autres interactions détectées par double-hybride.

La protéine chimérique Rsc4-Myc s'intègre normalement dans le complexe (B. Cairns, communication personnelle). Des données obtenues par G. Gendrel au laboratoire indiquent que l'interaction ABC27•Rsc4 est importante pour la viabilité des cellules. En effet, si l'interaction entre ABC27 et Rsc4 est importante, on peut penser que la délétion de la région d'interaction aura un effet délétère. Conformément à cette hypothèse, la délétion des 68 acides aminés C-terminaux est létale (G. Gendrel, communication personnelle). Toutefois, la partie C-terminale de Rsc4 n'est pas impliquée uniquement dans l'interaction de Rsc4 avec ABC27. En effet, l'équipe de B. Cairns a montré avec une délétion de taille similaire que la protéine Rsc4 tronquée ne s'intègre plus dans le complexe (B. Cairns, communication personnelle). La région carboxy-terminale de la protéine Rsc4 serait donc impliquée dans le ciblage et l'intégration de la protéine dans le complexe RSC ainsi que dans les interactions avec les ARN polymérases. D'autres données de G. Gendrel indiquent que les 3 derniers résidus de la protéine Rsc4 sont déterminants pour l'interaction avec la sous-unité ABC27. La délétion de ces 3 acides aminés induit un phénotype thermosensible et une perte de l'interaction double-hybride (G. Gendrel, communication personnelle).

II. Effet de la mutation *rsc4-myc* sur la croissance

Rsc4 est une protéine essentielle de 652 acides aminés, codée par le gène YKR008W. Elle porte deux motifs de type bromodomaine. Ces deux bromodomains sont les seules régions retrouvées dans des protéines d'eucaryotes supérieurs. Il a été proposé que la protéine humaine Baf180, appartenant au complexe SWI/SNF-B, soit une fusion des protéines Rsc1, Rsc2 et Rsc4 (Xue *et al.*, 2000).

La souche MW3461 (*rsc4-myc rpc160-Δ::HIS3 pC160-240 (CEN4 URA3 rpc160-240)*) a été construite de façon à rechercher la co-immunoprécipitation avec l'ARN polymérase III. Nous nous sommes aperçus que la présence des deux protéines étiquetées HA-C160 et Rsc4-Myc a des effets additifs. Nous avons donc

séparé les allèles *rpc160-240* et *rsc4-myc* par croisement avec une souche sauvage. Un deuxième croisement a été fait sur une spore thermosensible et portant la mutation *rsc4-myc*. Les résultats de ces croisements sont davantage détaillés dans le paragraphe IV.2.4. Tous les effets de croissance présentés ci-dessous concernent des souches sauvages pour le gène *RPC160*.

II.1. Thermosensibilité du mutant *rsc4-myc*

L'insertion des épitopes Myc en position C-terminale de la protéine Rsc4 est responsable d'un phénotype thermosensible récessif (figure 30). Cette thermosensibilité est peut-être corrélée à la perte de l'interaction avec ABC27 (figure 29). La souche mutante a un ralentissement de croissance de 25 à 34°C par rapport à la souche sauvage et est incapable de pousser à 37°C. Son temps de génération est de l'ordre 2 heures 45 minutes contre 2 heures pour la souche sauvage correspondante. L'arrêt de croissance est long à survenir, mais un net ralentissement de croissance est observé après environ 12 heures à 37°C. La liaison génétique entre la mutation *rsc4-myc* et l'altération de la croissance a été montrée par l'analyse de la descendance d'un croisement avec une souche sauvage (figure 30). De plus, nous avons remarqué l'apparition de défauts morphologiques associés à la présence de la mutation *rsc4-myc*. Après passage à température restrictive, des cellules "déformées" qui ont tendance à être plus grosses et à avoir plusieurs bourgeons apparaissent (figure 31).

II.2. Autres phénotypes du mutant *rsc4-myc*

Les mutants de RSC présentent une sensibilité à diverses substances (figure 32 ; Cairns *et al.*, 1998 ; Cairns *et al.*, 1999 ; Angus-Hill *et al.*, 2001). Le bénomyl est un antifongique qui agit en déstabilisant les microtubules du fuseau mitotique. Plusieurs publications font état d'une sensibilité de mutants de RSC aux drogues déstabilisant les microtubules (Chai *et al.*, 2002 ; Hsu and Laurent, 2002). La mutation *rsc4-myc* confère une forte sensibilité à cette drogue indiquant que le fonctionnement des microtubules pourrait être altéré. Le mutant *rsc4-myc* est sensible à des concentrations de bénomyl allant de 5 à 10 µg/ml et n'est plus capable de pousser sur des milieux contenant des concentrations supérieures à 10 µg/ml. Le défaut de croissance du mutant *rsc4-myc* est également très accentué en présence de 4mM de caféine, un analogue structural des bases puriques qui interfère avec de nombreux processus cellulaires (figure 32 A ; Hampsey, 1997). Les défauts de croissance associés aux hautes forces osmotiques sont généralement associés à des défauts dans la paroi cellulaire ou dans le cytosquelette (Hampsey, 1997). Les études menées dans le laboratoire de B. Cairns indiquent que les mutants du complexe RSC sont sensibles aux hautes concentrations salines et que la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la génèse et la maintenance de la paroi est perturbée. J'ai donc testé la capacité du mutant *rsc4-myc* à croître sur un milieu contenant du chlorure de sodium. Le défaut de croissance à température permissive du mutant *rsc4-myc* est fortement aggravé en présence de 500 mM de chlorure de sodium (figure 32 A).

Nous observons d'autres phénotypes de croissances liées à la mutation dans le gène *RSC4*. Le sorbitol permet parfois de supprimer un phénotype de croissance (Hampsey, 1997 ; Angus-Hill *et al.*, 2001 ; Chai *et al.*, 2002). L'addition de sorbitol à la concentration de 1M ne permet pas d'améliorer la croissance du mutant à 30°C et à 37°C, ce qui distingue le mutant *rsc4-myc* d'autres mutants de RSC dont le défaut de croissance est supprimé par l'ajout de sorbitol (Angus-Hill *et al.*, 2001 ; Chai *et al.*, 2002).

La formamide (2 %), qui peut déstabiliser les liaisons hydrogène (Hampsey, 1997), inhibe la croissance du mutant à température permissive alors que le sauvage n'est que peu affecté (figure 32 B).

Enfin, les interactions entre les ARN polymérases et le complexe RSC nous ont amenés à proposer que RSC pourrait intervenir pour faciliter l'élongation de la transcription. L'acide mycophénolique inhibe une des enzymes de la voie de biosynthèse du GTP, ce qui a pour conséquence de diminuer le pool interne de GTP (Exinger and Lacroute, 1992). La sensibilité à cette drogue est utilisée pour caractériser des défauts d'élongation de la transcription. J'ai testé la croissance à 30°C sur milieu minimum avec une gamme croissante d'acide mycophénolique (1 µg/ml à 10 µg/ml), mais aucune différence significative de croissance n'est visible. Il semble donc que le mutant *rsc4-myc* ne soit pas affecté dans l'élongation de la transcription.

En conclusion, le mutant *rsc4-myc* a des phénotypes similaires à ceux des autres mutants de RSC. L'aggravation du défaut de croissance en présence de chlorure de sodium suggère comme pour les autres mutants de RSC des problèmes liés à la paroi cellulaire. La différence principale entre notre mutant et les autres mutants de RSC décrits réside dans le fait que sa thermosensibilité n'est pas supprimée par le sorbitol. La sensibilité des mutants de RSC à l'acide mycophénolique n'a pas été décrite. Nous ne pouvons donc pas savoir si l'insensibilité des mutants de RSC est une caractéristique générale.

III. Étude de la transcription par les ARN polymérases I et III dans le mutant *rsc4-myc*.

Nous avons posé l'hypothèse que le complexe RSC intervienne dans la transcription de certains gènes en permettant la mobilisation des nucléosomes. Les mutations dans ce complexe sont donc susceptibles d'entraîner des défauts de transcription. Ce chapitre est principalement consacré aux résultats concernant la transcription par la pol I et la pol III dans le mutant *rsc4-myc*. Nous avons également

obtenu des résultats sur un autre mutant du complexe RSC, *rsc1-Δ*, qui seront présentés dans le paragraphe suivant.

III.1. Effet de la délétion du gène RSC1.

N. Gagne (stagiaire au laboratoire) a réalisé la délétion du gène *RSC1* (figure 33) dans la souche YPH500 (Sikorski and Hieter, 1989). Conformément à ce qui a été publié par B. Cairns et collaborateurs, la délétion du gène *RSC1* provoque un léger ralentissement de croissance (Cairns *et al.*, 1999). La technique de marquage *in vivo* des ARN à l'uracile tritié est utilisée pour analyser la néosynthèse d'ARN par les ARN polymérases I et III. La comparaison entre les souches mutante et sauvage de la quantité de tritium incorporé dans les acides nucléiques permet de mettre en évidence des défauts de synthèse (Stettler *et al.*, 1992). La quantité d'ARN néosynthétisés dans la souche *rsc1-Δ* est équivalente à celle de la souche YPH500 à 30°C et après 5 heures à 37°C (résultat non montré). Il semble que la délétion du gène *RSC 1* n'ait pas d'effet sur la transcription pol I et pol III ou que ces défauts surviennent après un temps plus long de culture à 37°C.

La protéine Rsc2 est un homologue de Rsc1. Ces deux protéines appartiennent à deux formes différentes du complexe RSC et ne sont pas interchangeables *in vivo* (Cairns *et al.*, 1999). La délétion des deux gènes séparément est viable mais entraîne des défauts de croissance spécifique. En revanche la délétion simultanée des deux gènes est létale (Cairns *et al.*, 1999). Les deux formes du complexe ne sont donc pas totalement redondantes, mais il pourrait y avoir des mécanismes de compensation. Ceci pourrait expliquer que nous n'avons pas vu de défauts de transcription par la pol I ou la pol III par marquage *in vivo*. Compte tenu de l'absence de défauts transcriptionnels et de la redondance Rsc1/Rsc2 nous avons décidé de ne pas poursuivre l'étude du mutant *rsc1-Δ*.

III.2. Effets de la mutation *rsc4-myc* sur la transcription par les ARN polymérases I et III

Pour étudier l'impact de la mutation *rsc4-myc* sur la néosynthèse des ARN, nous avons réalisé comme dans le cas de la souche *rsc1-Δ*, des marquages radioactifs des ARN *in vivo*. Les expériences présentées dans ce chapitre ont été faites à partir des souches MW671 (*rpc160-Δ::HIS3 pC160-240 (CEN4 URA3 rpc160-240)*) et sa dérivée MW3461 contenant la mutation *rsc4-myc*. Un premier résultat a été obtenu au laboratoire par A. Flores par marquage à l'uracile tritié. Ses expériences montraient une très légère diminution de la synthèse des ARN après 6 heures de culture à température restrictive.

Nous avons voulu confirmer ce résultat en utilisant la méthode de marquage des ARN par incorporation de ^{33}P (Rubin, 1975). Nous avons analysé la néosynthèse des ARN à 30° et après 12 et 20 heures de culture à température restrictive. Comme le montre la figure 34, une chute très importante de la quantité de phosphate radioactif incorporé dans les ARN est visible après 12 heures à 37°C (piste 2). La souche de référence (MW671) présente un taux de néosynthèse constant à tous les points de marquage (pistes 4 à 6). La quantité d'ARN marqués à 30°C dans le mutant est légèrement plus faible que celle du sauvage (pistes 1 et 4). Après 20 heures de culture à 37°C, les cellules du mutant *rsc4-myc* sont quasiment en arrêt de croissance (figure 35), ce qui expliquerait que le taux de phosphate incorporé soit aussi bas et encore réduit par rapport au temps 12 heures. La chute d'incorporation de phosphate est parallèle à une diminution de la quantité de phosphate qui entre dans les cellules (environ 90% pour la souche de référence contre 80% puis 30% et 30% dans le mutant). Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer la diminution d'incorporation de phosphate : un blocage de la transcription ou un problème d'entrée et/ou d'utilisation du phosphate.

Nous avons alors décidé d'analyser les défauts transcriptionnels par Northern Blot sur des précurseurs d'ARN ribosomiques et d'ARN de transfert (figure 37 et 38). Ces expériences mettent en évidence une différence dans le profil du mutant *rsc4-myc*. L'ARN 35S, transcrit par la pol I, est le précurseur des ARN ribosomiques 18S, 25S et 5.8S. Sa maturation, dont un schéma est présenté sur la figure 36, fait intervenir une série de modifications de bases et clivages. Une cinétique a été réalisée entre 0 et 18 heures de culture à 37°C. La quantité du précurseur 35S a été estimée à l'aide d'une sonde située dans le fragment 5' A0A1 (Torchet *et al.*, 1998). La mutation *rsc4-myc* s'accompagne d'une accumulation de l'ARN 35S. Le niveau de 35S dans le sauvage augmente au cours du temps de telle sorte que le ratio 35S/18S du sauvage rejoint le niveau du mutant en fin de cinétique (figure 37). Les mutants de l'ARN polymérase III présentent des défauts dans la maturation des ARN ribosomiques (Briand *et al.*, 2001a). Les souches que nous avons utilisées portent un allèle mutant de *RPC160*, l'augmentation de la quantité de l'ARN 35S résulte probablement d'une interférence de cette mutation dans *RPC160* avec la maturation de l'ARN 35S. Cet effet serait augmenté dans le mutant.

L'ARN 20S, précurseur de l'ARN 18S, a été détecté grâce à une sonde située dans sa région 3' (Torchet *et al.*, 1998). Il est moins abondant dans le mutant, mais son niveau reste constant au cours du temps (figure 37). Nous n'avons pas observé de différence significative entre les quantités du précurseur 27S de l'ARN 25S dans les deux souches. L'ARNt Leu (CAA) a servi de contrôle de la quantité de transcrits produits par la pol III. La quantification des ratios 18S/ARNt ne fait pas apparaître de différences significatives entre les deux souches.

Ng et collaborateurs ont recherché par immunoprécipitation de chromatine (ChIP) la localisation de RSC au niveau des régions intergéniques et ont mis en évidence une association privilégiée de RSC avec les régions en amont des gènes transcrits par la pol III (Ng *et al.*, 2002). Il semble que RSC soit difficile à ponter à l'ADN. Plusieurs expériences à partir de sous-unités différentes ont été réalisées. Les

données d'immunoprécipitation ont été ensuite rassemblées et traitées statistiquement de façon à extraire leurs valeurs significatives.

Sept copies du gène de l'ARNt Lys (UUU) sont réparties dans le génome. Ces données de ChIP suggèrent que RSC est présent dans les régions intergéniques en amont de 4 de ces 7 copies. Nous n'avons pas cependant observé de différences notables dans la quantité du précurseur de cet ARNt par rapport à la forme mature (figure 38). De même, le complexe RSC se lierait à 8 des 10 régions intergéniques en amont des copies du gène de l'ARNt Leu (CAA). Mais dans ce cas également, nous n'avons pas observé de diminution de la quantité du précurseur de cet ARNt dans la souche mutante. Ces expériences de Northern blot suggèrent donc qu'il n'y a pas de défauts majeurs de transcription des ARN de transfert par l'ARN polymérase III.

Les expériences de Northern blot ne nous permettent pas de mettre en évidence de défaut de synthèse des ARN ribosomiques et de transfert. Un arrêt de transcription par l'ARN polymérase I est peu probable car cela se traduirait par une disparition des espèces de la voie de maturation. Par contre, nous observons des modifications dans le profil de maturation de l'ARN 35S. La chute d'incorporation de phosphate radioactif observée lors du marquage *in vivo* semble donc être due à des défauts dans la voie d'utilisation du phosphate (voir partie sur l'analyse du transcriptome et discussion). La présence de plusieurs défauts se traduit par des effets composites et nous empêche de déterminer s'il existe un défaut transcriptionnel. Dans le cas des ARN de transfert, la présence de plusieurs copies des gènes pourraient permettre des compensations et expliquer l'absence de défauts. Toutefois, d'autres données du laboratoire sur ce mutant indique que le complexe RSc pourrait intervenir dans la transcription par l'ARN polymérase III de certains gènes (voir partie discussion).

IV. Étude du transcriptome

Pour étudier l'impact de la mutation *rsc4-myc* sur la transcription par l'ARN polymérase II, nous avons choisi une approche globale par puces à ADN. Notre service dispose en effet de puces, produites par le Service de Génomique Fonctionnelle (SGF) du CEA/Evry, comportant l'ensemble des cadres ouverts de lecture (ORF, open reading frame) de levure. La méthode du Northern blot ne nous aurait permis de n'analyser qu'un petit nombre de gènes. D'autre part, au moment où nous avons commencé cette étude, une seule cible du complexe RSC, le gène *CHA1*, était connue (Moreira and Holmberg, 1999). Le prochain chapitre est consacré à une présentation de la technique des puces à ADN, à ses avantages et limites. Les méthodes d'analyse et de normalisation des données utilisées pour l'étude du mutant *rsc4-myc* sont précisées dans le paragraphe IV.1.3.

IV.1. Principes d'utilisation des puces à ADN.

La technique des puces à ADN (hybridation sur lame de verre) est basée sur l'hybridation entre des sondes fixées sur un support solide et un mélange complexe de cibles marquées. L'hybridation sur puces à ADN s'apparente aux techniques de Southern et Northern blot. L'hybridation sur puces permet de mesurer simultanément les variations de la quantité de plusieurs milliers de transcrits entre deux conditions distinctes (revue dans Eisen and Brown, 1999 ; Lockhart and Winzeler, 2000 ; Southern, 2001 ; chapitres I, III et IV de Schena, 2000). La technologie Affymétrie ne sera pas abordée. Notons que, comme le Northern blot, les puces à ADN permettent d'évaluer des différences à l'équilibre, et non la néosynthèse des ARN. De plus, cette méthode ne donne pas de mesure des quantités absolues mais renseigne sur les variations relatives entre les deux échantillons hybridés.

Les **sondes** sont soit des fragments d'ADN obtenus par amplification PCR soit des oligonucléotides (Southern, 2001). Elles sont déposées (spotting) ou directement

synthétisés sur des lames de verres recouvertes d'un produit positivement chargée (polylysine, aminosilane ou superaldéhyde) avec un agencement déterminé. Les **cibles** sont des fragments d'acides nucléiques marqués qui sont hybridés avec les sondes (Southern, 2001). Deux types de marquages sont utilisés. Il s'agit de la fluorescence à l'aide des fluorochromes de type Cyanine (Cy3 et Cy5, Amersham Biosciences) ou analogues (Eisen and Brown, 1999) et de la radioactivité (Salin *et al.*, 2002). Cette dernière est peu utilisée.

IV.1.1. Obtention des cibles marquées et hybridation

La préparation des cibles marquées consiste à synthétiser l'ADN complémentaire des ARN et à incorporer des fluorochromes dans les ADNc (figure 39). Les ADNc marqués sont purifiés et hybridés simultanément sur la puce. L'incorporation peut être directe (Eisen and Brown, 1999) ou indirecte (Hughes *et al.*, 2001 ; Shoemaker *et al.*, 2001). Dans le cas du marquage direct, la synthèse de l'ADNc est faite en présence de nucléotides (dCTP ou dUTP) modifiés et qui portent le Cy3 ou le Cy5. L'incorporation indirecte s'effectue en deux phases. Dans un premier temps, les ADNc sont synthétisés en incorporant du dUTP portant une fonction aminoalyl (aa-dUTP). Les ADNc sont ensuite purifiés et couplés aux fluorochromes par réaction entre la fonction amine de l'aa-dUTP et la fonction ester des NHS-Cy3 et NHS-Cy5 (N-hydroxysuccinimidyl ester). La méthode par incorporation directe bien que plus simple donne des rendements inférieurs. Les fluorochromes Cy3 et Cy5 sont des molécules de grandes tailles qui sont difficilement acceptées par les transcriptases inverses. De plus, cette méthode introduit un biais entre les deux fluorochromes. En effet, en raison de sa plus grande taille, le Cy5-dUTP s'incorpore moins bien que le Cy3-dUTP et, certains ARN sont rétro-transcrits plus efficacement avec l'un ou l'autre des fluorochromes (forum genearrays <http://www.zenith.berkeley.edu/genearrays>). L'importance de ces biais est réduite par le marquage indirect. D'une part, il est meilleur en termes de rendement et de

fréquence d'incorporation. D'autre part, l'étape de transcription inverse est identique pour un même échantillon marqué par les deux fluorochromes, ce qui permet de réduire les sources de variabilité entre les lames inversées (X-Cy3/Y-Cy5 et X-Cy5/Y-Cy3), une inversion des fluorochromes nécessaire pour tenir compte des propriétés spectrales et contrôler la variabilité des lots.

IV.1.2. Les puces à ADN, leurs avantages et leurs limites

La technique des puces, comparée aux méthodologies "classiques" de Northern Blot et de RT-PCR, permet d'analyser un très grand nombre de gènes voire la totalité du transcriptome et ce en une seule fois. L'intégralité de la séquence du génome de la levure étant connue, toutes les séquences peuvent être représentées sur la puce. La puissance de cet outil réside également dans le fait qu'aucune idée préconçue n'est requise dans l'analyse : il n'y a pas besoin d'avoir *d'a priori* sur les gènes potentiellement dérégulés.

Les sources de variabilité dans des expériences d'hybridation sont la variabilité inter-échantillons (variabilité biologique) et la variabilité de l'hybridation (variabilité due à la technique en elle-même). La répétition d'une expérience d'hybridation à partir de deux échantillons indépendants peut conduire à des résultats assez différents. Des petites modifications des conditions de culture, du traitement des cellules peuvent conduire à des différences dans la réponse des cellules. Pour ce qui est de l'extraction des ARN, nous utilisons des kits commerciaux qui donnent des rendements et des qualités constants d'une extraction à l'autre. Dans la phase d'hybridation, les sources de variabilités résident dans les supports en verre utilisés (y compris au sein d'un même lot), les quantités de sondes déposées (qui varient d'une lame à l'autre et d'un spotting à l'autre), l'étape d'hybridation même et notamment dans le bruit de fond qui en résulte. La qualité variable de l'hybridation d'une lame à l'autre contraint l'expérimentateur à réaliser des hybridations compétitives et impose l'emploi de deux fluorochromes distincts dont les propriétés

spectrales sont différentes. Ces différences physiques des cyanines 3 et 5 imposent par conséquent de répéter plusieurs fois indépendamment l'expérience en permutant les sens de marquage.

D'autre part, se pose le problème des hybridations aspécifiques ou croisées. Les hybridations aspécifiques se traduisent par un bruit de fond au niveau de spot. L'intensité de ces hybridations peut être estimée à l'aide d'un ADN exogène n'ayant pas un fort pourcentage d'identité global ou dans certaines régions avec des séquences codantes de la levure. J'appelle hybridation croisée, une hybridation spécifique mais qui correspond à des transcrits différents (gènes paralogues). Dans un Northern blot, les ARN (cibles) sont séparées physiquement avant l'hybridation, ce qui peut permettre de discriminer en fonction de leurs tailles des transcrits s'hybridant à la même sonde. En revanche, dans une hybridation sur puces à ADN, les cibles ne sont pas séparées. Ceci a pour conséquence que deux cibles distinctes, si elles sont très semblables, peuvent s'hybrider sur un même spot. Les signaux mesurés peuvent donc contenir une fraction due à l'hybridation de plusieurs transcrits. On estime généralement que deux gènes dont les séquences nucléotidiques ont plus de 70 % d'identité ne sont pas différenciables par cette technique. Ceci doit évidemment être modulé par la répartition des régions de similitudes le long de la séquence nucléotidique. L'utilisation de sondes correspondant à des régions spécifiques peut alors permettre de résoudre ce problème. Les produits PCR déposés sur les puces que nous avons utilisées contiennent l'intégralité des ORF. Les valeurs mesurées pour des gènes doivent donc être interprétées avec prudence.

IV.1.3. Fabrication des puces.

Les puces à ADN utilisées pour cette étude nous ont été fournies par le Service de Génomique Fonctionnelle du CEA/Evry. Une collection de 6 144 ORF de *S. cerevisiae* a été achetée auprès de la société *Research Genetics*. Ces ORF ont été amplifiées par PCR à partir d'un couple d'amorces uniques. Les produits PCR ont ensuite été purifiés par précipitation et resuspendu dans du DMSO 50% TE 1X à une concentration moyenne de 100 ng/μl. Leur qualité a été vérifiée sur gel d'agarose. Les ADN ont ensuite été déposés sur des lames recouvertes d'aminosilane (CMT

GAPSII Corning) à l'aide d'un robot Microgrid II (Biorobotics). Ces puces à ADN ont déjà été utilisées au laboratoire, notamment dans le cadre d'une étude sur la réponse au cadmium (Fauchon *et al.*, 2002). Cette étude montre que la reproductibilité de l'hybridation sur ces lames est comparable à celle obtenue à partir de lames commerciales Corning.

IV.1.4. Acquisition des données et analyse

Les lames ont été scannées à des longueurs d'onde de 635 nm (Cy5) et 532 nm (Cy3) avec un scanner GENEPIX 4000B et analysées avec le logiciel GENEPIX pro 3.0 (Axon Instruments, Inc.). Pour chaque pixel, un ratio entre l'intensité des signaux à 635 nm et 532 nm est calculé. Nous avons utilisé la valeur médiane de ces ratios pour évaluer la variation de l'expression des gènes. La valeur médiane a été préférée à la moyenne car elle est moins sensible que la moyenne à des valeurs extrêmes. Les ratios bruts sont ensuite normalisés de façon à corriger les biais dus aux variations expérimentales, aux paramètres de scanning et aux propriétés spectrales des fluorochromes. Pour cela, nous postulons que la grande majorité des gènes n'est pas affectée dans les conditions expérimentales choisies. La moyenne des ratios, pour l'ensemble des gènes représentés sur la puce, est alors égale à 1. Les ratios bruts ont donc été multipliés par le facteur de correction (median of ratio), issu de l'analyse par le logiciel GENEPIX, de manière à ramener cette moyenne à 1. Les spots irréguliers ou "contaminés" (poussière, taches, rayures...) sont éliminés de l'analyse. De plus, ceux pour lesquels les intensités sont trop proches de celles du bruit de fond ne sont pas retenus. Seuls les spots dont au moins 70 % des pixels ont des intensités supérieures au bruit de fond plus deux fois son écart-type dans l'un ou l'autre des canaux ont été conservés pour les analyses ultérieures (Fauchon *et al.*, 2002). Enfin, le critère de la "somme des médianes", calculée par le logiciel GENEPIX, a également été pris en compte. Ce critère renseigne sur l'intensité du signal par rapport au bruit de fond. Le seuil a été fixé arbitrairement à 500. Les spots pour lesquels la somme des

médianes est inférieure à cette valeur ont été écartés des analyses. Enfin, les spots saturés ne doivent pas être pris en compte. Afin de conserver les informations contenues dans ces spots, nous avons réalisé un deuxième scan en ajustant les paramètres du photomultiplicateur, de façon à ne plus avoir aucun spot saturé dans les deux longueurs d'onde. Les données normalisées ont ensuite été traitées avec le logiciel GeneSpring (*Silicon Genetics*).

IV.2. Étude du transcriptome du mutant *rsc4-myc*

L'étude complète du transcriptome a été réalisée avec des souches sauvages pour le gène *RPC160*. Quelques hybridations, faites à partir des souches portant l'allèle *rpc160-240*, ont donné des résultats similaires. L'analyse du transcriptome a été réalisée sur des cellules cultivées en phase exponentielle à 30° puis pendant 6 heures à 37°C. Le mutant *rsc4-myc* a été comparé à la souche isogénique sauvage YPH499, cultivée dans les mêmes conditions. Pour chaque température, 6 hybridations (correspondant à trois permutations des fluorochromes), ont été réalisées à partir de 2 échantillons indépendants. Le marquage des sondes a été fait selon la méthode indirecte (figure 39). Ont été considérés comme induits et réprimés les gènes dont la quantité de transcrits varie d'un facteur 2 et plus et pour lesquels au moins 4 valeurs sur les 6 hybridations sont disponibles.

Au total, 6216 gènes sont représentés sur la puce dont 11,3 % (environ 700) n'ont pas été amplifiés correctement et ne doivent pas de ce fait être pris en compte. Parmi les gènes exploitables, 4217 et 4571 gènes ont au moins 4 valeurs à 30°C et 37°C (soit respectivement 76,5 % et 82,9 % ; tableau V). Tous les gènes ne sont probablement pas exprimés dans les conditions dans lesquelles les souches ont été cultivées et une partie des spots non exploitables correspond en fait à des gènes qui ne sont pas exprimés ou à des taux extrêmement faibles.

IV.2.1. Nombre de gènes affectés

Bien que le mutant *rsc4-myc* n'ait qu'un faible ralentissement de croissance sur boîte à 30°C, 181 gènes sont déjà stimulés et 30 gènes réprimés plus de 2 fois (soit 3,8 % de gènes dérégulés). À 37°C, ces valeurs sont respectivement de 140 et 30 (soit 3 % de gènes dérégulés). Le nombre de gènes affectés est du même ordre de grandeur que ce qui a été généralement décrit dans les études de transcriptome (environ 5 %) et notamment celles concernant des mutants des complexes SWI/SNF et RSC (Holstege *et al.*, 1998 ; Sudarsanam *et al.*, 2000 ; Angus-Hill *et al.*, 2001 ; Damelin *et al.*, 2002). Plus de 50 % des gènes affectés à température restrictive le sont également à température permissive (figure 40 et tableau V). De plus, le passage à température restrictive ne semble pas beaucoup aggraver les défauts transcriptionnels. Le fait de trouver des gènes induits et réprimés indique que RSC intervient pour stimuler et réprimer la transcription.

IV.2.2. Types de gènes affectés

Contrairement à ce qui a été observé pour les mutants de Rsc3, Rsc30 et Rsc9, aucune catégorie fonctionnelle ne semble particulièrement affectée par la mutation *rsc4-myc*. Quelques gènes impliqués dans la biogénèse et la maintenance de la paroi ou le métabolisme du phosphate sont dérégulés. Les tableaux VI et VII présentent respectivement les 30 gènes les plus dérégulés à 30°C et 37°C. La majorité de ces gènes est affectée aux deux températures conformément à ce que l'on observe sur l'ensemble de l'analyse. Plusieurs gènes de la voie de biosynthèse de la thiamine ou de la famille des séripaupérines sont dérégulés. Toutefois, on ne peut pas conclure à un contrôle de la transcription de ces gènes par RSC. En effet, le gène *THI5* a 3 homologues dont les séquences nucléotidiques sont pratiquement identiques. De même, les gènes *PAU* sont extrêmement similaires entre eux. Les signaux dus à ces

différents homologues ne sont donc pas distinguables par hybridation et il est impossible de savoir si toutes les isoformes sont dérégulées ou bien si seules quelques-unes le sont dans le mutant *rsc4-myc*.

Nous n'avons pas noté de dérégulations nettes des gènes encodant les protéines ribosomales contrairement à ce qui est observé pour des mutants de *RSC3* (Angus-Hill *et al.*, 2001 ; Damelin *et al.*, 2002). Le complexe RSC est présent au niveau du promoteur des gènes d'histone *HTA1/HTB1* et est nécessaire à la répression de leur transcription à certaines phases du cycle cellulaire (Damelin *et al.*, 2002 ; Ng *et al.*, 2002). Nos données ne permettent pas de conclure formellement à une dérégulation de ces deux gènes. En effet, les valeurs des ratios d'expression sont légèrement supérieures à 0,5 et tendent à indiquer une diminution de leur transcription. Nos expériences ont été réalisées sur des cellules non synchronisées. Par conséquent, nous mesurons une moyenne sur l'ensemble des phases du cycle. Nous ne pouvons donc pas conclure à une influence de la mutation *rsc4-myc* sur la transcription des gènes d'histones. Une explication possible est que la mutation *rsc4-myc* n'affecte pas le recrutement et/ou la fonction de RSC au niveau de ces gènes de ces catégories fonctionnelles.

La comparaison des gènes dérégulés par la mutation *rsc4-myc* et ceux dérégulés par des mutations dans le complexe SWI/SNF (Sudarsanam *et al.*, 2000) montre qu'il n'y a pas de chevauchement des deux ensembles de gènes. Ceci indique que malgré les similitudes existant entre les complexes RSC et SWI/SNF, ces deux complexes régulent l'expression de groupes de gènes distincts et ne sont pas redondants.

IV.2.3. RSC et le chromosome XII

Les images de deux hybridations de lames inversées sont présentées sur la figure 41. Le panneau de droite est un agrandissement d'une zone de la lame. La position des gènes stimulés y est précisée. À l'issue de l'analyse, les gènes ont été classés en fonction du chromosome sur lequel ils sont localisés (figure 42). Chaque gène est représenté par un trait dont la couleur varie en fonction du ratio d'expression. Le rouge indique une induction, le bleu une répression et le jaune un ratio proche de 1. Le trait gris indique que les données ne sont pas disponibles (spot non exploitable, "contaminé", éliminé à l'analyse...). La grande majorité des gènes stimulés sont portés par le chromosome XII (figures 40 à 44 et tableau V). Cet effet se manifeste dès la température permissive. Notons de plus que l'on observe l'induction de plusieurs gènes situés au niveau de télomères.

Alors que le chromosome XII porte 8,69 % des ORF, 38,25 % et 51,75 % des gènes stimulés plus de 2 fois à 30°C et 37°C sont localisés sur ce chromosome (figure 43). Le test statistique du χ^2 indique que, conformément à ce que l'on peut penser, cette distribution n'est pas conforme à la distribution aléatoire théorique. Ce test appliqué aux gènes induits renvoie une valeur de 94,79 alors que la valeur seuil de rejet à 5 % est 25. En revanche, la valeur du χ^2 est de 13,48 pour les gènes réprimés. La distribution de ces gènes n'est donc pas statistiquement différente de la distribution aléatoire théorique. Nous avons posé comme hypothèse que la moyenne globale des variations est 1 (valeur expérimentale normalisée à 1,12 et 1,09 à 30°C et 37°C). Alors que la valeur moyenne des ratios d'expression est proche de 1 pour tous les chromosomes, le chromosome XII se différencie nettement des autres chromosomes avec des moyennes de 1,74 (30°C) et 1,80 (37°C) respectivement (figure 44). Nous concluons donc que de très nombreux gènes du chromosome XII sont dérégulés.

D'autres études ont été menées au laboratoire avec ces puces à ADN (Fauchon *et al.*, 2002), mais aucune n'a révélé un profil similaire à celui du mutant *rsc4-myc*. D'autre part, quelques expériences sur un mutant *rsc4-myc* ont été faites sur des puces à ADN commerciales (Corning). Le profil d'expression était similaire à celui obtenu avec les puces du CEA/Evry. Ceci prouve donc que le profil d'expression observé n'est pas un artéfact lié aux puces que nous avons utilisées.

IV.2.4. Une duplication du chromosome XII ?

Le profil d'expression génomique particulier du mutant *rsc4-myc* pourrait s'expliquer par duplication du chromosome XII. Une étude récente sur environ 300 mutants a révélé que les phénomènes d'aneuploïdie sont fréquents dans les souches de levure de laboratoire dans lesquelles un gène est délété (Hughes *et al.*, 2000). Environ 8 % des souches testées présentent des duplications partielles ou totales de certains chromosomes. Cette aneuploïdie s'accompagne d'une augmentation de la transcription des gènes dupliqués. La duplication d'une partie de leur génome confère à certains de ces mutants un net avantage de croissance. De plus, dans certains cas, le fragment dupliqué porte un gène codant une protéine à celle codée par le gène délété. Ce mécanisme de duplication pourrait permettre de pallier la perte de fonction d'un gène et l'apparition d'une aneuploïdie s'apparenterait alors à un mécanisme de suppression (Hughes *et al.*, 2000). Toutefois, il n'existe pas sur le chromosome XII, comme dans le reste du génome, de gènes encodant une protéine similaire à la protéine Rsc4. La duplication du chromosome XII ne permettrait donc pas de pallier la déficience de la protéine Rsc4.

Par ailleurs, dans des souches polyploïdes, la majorité des gènes n'est pas affectée. Par contre, certains gènes sont induits ou réprimés proportionnellement à la ploïdie de la souche. La quantité de transcrits de certains gènes peut être modulé par le nombre de copies du gène (Galitski *et al.*, 1999).

Le caryotypage est susceptible de mettre en évidence des anomalies chromosomiques (polysomies, translocation, intégration...). Afin de vérifier l'hypothèse d'une aneuploïdie du chromosome XII, nous avons réalisé un caryotype (figure 45) des souches MW671 (*rpc160-Δ::HIS3 pC160-240 (CEN3 URA3 rpc160-240)*) et MW3461 (*rpc160-Δ::HIS3 pC160-240 (CEN3 URA3 rpc160-240) rsc4-myc*). Des expériences d'hybridation sur puces utilisant ces souches font également apparaître la stimulation des gènes portés par le chromosome XII (données non présentées). Le caryotypage a été fait en collaboration avec V. N'Guyen (laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire, INRA Grignon). Nous n'avons pas observé de modification du profil électrophorétique dans le mutant, ce qui suggère qu'il n'y a pas de duplication du chromosome XII complète ni de duplication suivie d'une intégration dans d'autres chromosomes.

Comme cela a été mentionné précédemment, nous avons séparé les gènes recombinants *rpc160-240* et *rsc4-myc* afin de replacer ce dernier dans un contexte chromosomique sauvage pour le gène *RPC160* et de vérifier que la thermosensibilité est bien liée à la mutation. L'analyse de la descendance de ces croisements nous a fourni des arguments supplémentaires en la défaveur d'une duplication du chromosome XII. Les croisements ont été faits de la manière suivante. Dans une première étape, la souche MW3461 a été croisée avec la souche isogénique YPH500. La présence du plasmide centromérique pC160-240 réduit le nombre de tétrades complètes que l'on peut obtenir et une seule tétrade complète a été isolée dans laquelle les mutation *rpc160-240* et *rsc4-myc* sont séparées. Elle présentait une ségrégation conjointe et de type 2:2 du caractère thermosensible et de la mutation *rsc4-myc*. À partir d'une spore thermosensible contenant la mutation *rsc4-myc*, nous avons réalisé un rétrocroisement avec la souche YPH500. On peut supposer que si la duplication du chromosome XII a eu lieu, elle est nécessaire à la viabilité du mutant *rsc4-myc* et qu'alors on ne peut pas séparer le chromosome surnuméraire de la mutation *rsc4-myc* sans entraîner une létalité ou du moins un fort retard de

croissance. Si toutefois cette duplication n'était pas absolument nécessaire à la survie du mutant alors la probabilité qu'elle soit restée associée à la mutation *rsc4-myc* après

deux divisions méiotiques est de 1/4. Supposons que la duplication confère un avantage de croissance. Deux hypothèses sont possibles pour expliquer le maintien de la copie supplémentaire : une duplication complète indépendante ou bien une duplication suivie d'une fusion avec un autre chromosome. Or, nous n'observons pas d'anomalie dans le caryotype, ce qui réfute la deuxième possibilité. On peut s'attendre à ce que la présence d'un chromosome surnuméraire perturbe le déroulement de la méiose car le chromosome surnuméraire ne peut pas s'associer à un chromosome homologue pendant la première division. Par ailleurs, le gène *RSC4* correspond à l'ORF YKR008W sur le chromosome XI, ce qui nous permet de faire l'hypothèse que le gène *RSC4* ségrège indépendamment du chromosome surnuméraire en méiose. Ceci implique que la fréquence des ditypes parentaux devrait être identique à celles de ditypes recombinants. Les ditypes parentaux correspondraient aux tétrades complètes et les ditypes recombinants aux tétrades à deux spores viables. Enfin, les tétratypés compteraient 3 spores viables (figure 46).

Dans le rétrocroisement, 18 tétrades ont été disséquées dont 15 étaient complètes (83 %). Les 3 autres tétrades n'avaient que deux spores. Nous n'avons pas obtenu de tétratypé (3 spores viables). Le fort pourcentage de tétrades complètes indique qu'il n'y a pas de graves perturbations de la méiose. Dans les tétrades complètes, toutes présentaient deux spores plus petites porteuses de la mutation *rsc4-myc*. La liaison de la thermosensibilité avec la mutation *rsc4-myc* a été vérifiée sur quelques tétrades. Les tétrades à 2 spores sont composées d'une spore ralentie et d'une spore sauvage, ce qui n'est pas conforme à la croissance attendue pour les ditypes recombinants (2 spores à croissance sauvage) dans l'hypothèse que nous avons formulée. L'hypothèse de l'égalité des fréquences des ditypes parentaux et recombinants n'est pas validée. Cela indique donc qu'il n'y a pas de ségrégation indépendante ou plus vraisemblablement que le chromosome XII n'a pas été dupliqué. Ces données nous permettent également d'écarter *a priori* l'existence de polysomies (trisomie et plus). En effet, dans le cas d'une trisomie du chromosome

XII, à l'issue du premier croisement, on se trouve alors dans le cas de figure d'une disomie (figure 46). De plus, en cas de polysomies, on devrait voir une augmentation

franche de l'intensité de la bande correspondant au chromosome XII dans le caryotype. Or, nous n'observons pas une telle augmentation (figure 45). Au vu de ces différentes données, nous pouvons en conclure que le profil transcriptionnel particulier du mutant *rsc4-myc* n'est pas la conséquence d'une aneuploïdie du chromosome XII.

IV.2.5. Chromosome XII, transcription par l'ARN polymérase I et ADNr

Il est possible que le comportement transcriptionnel du chromosome XII dans le mutant *rsc4-myc* soit dû à la présence et/ou à la transcription de l'ADNr sur ce chromosome. En effet, chez la levure, les 100 à 200 répétitions d'ADN ribosomiques sont toutes regroupées en un locus porté par le chromosome XII. Les gènes d'ADNr sont le siège d'une transcription très active (les ARN ribosomiques représentent 80 à 85 % des ARN totaux). La moitié des copies environ est dépourvue de nucléosomes et est transcriptionnellement active (Dammann *et al.*, 1993, 1995) ; chapitre II.3.2 de l'introduction). De plus, l'ADNr confère au chromosome XII des particularités structurales. En effet, dans un mutant de la topoisomérase I, le chromosome XII n'est pas visible en électrophorèse en champs pulsé car il reste au niveau des puits du gel (Christman *et al.*, 1993). Ce comportement est lié à la présence de l'ADNr car la translocation d'une partie de l'ADN ribosomique (environ 50 copies) sur le bras gauche du chromosome III dans un mutant de la topoisomérase I induit un comportement électrophorétique du chromosome III chimérique semblable à celui du chromosome XII (Christman *et al.*, 1993).

Nous proposons le modèle suivant pour expliquer l'induction transcriptionnelle des gènes localisés sur chromosome XII. Le complexe RSC coopère avec l'ARN polymérase I pour maintenir les copies actives sans nucléosomes. Ceux-ci seraient alors déplacés vers les gènes situés de part et d'autre. La mutation *rsc4-myc* a pour conséquence dans ce modèle d'affaiblir la coopération pol I/RSC. L'ADNr serait alors

en partie "réenvahi" par des nucléosomes, permettant ainsi l'activation des gènes transcrits par la pol II (figure 47). Notons toutefois, que dans un tel modèle, on peut

s'attendre à observer un effet polaire. Or, nous n'observons pas de gradient de stimulation de chaque côté de l'ADNr.

Nous avons analysé les profils d'expression génomiques de mutants de l'ARN polymérase I. Aucune des mutations dans l'ARN polymérase I testées ne modifie l'expression du chromosome XII. L'arrêt de la transcription pol I n'est donc pas suffisante pour induire un profil d'expression particulier pour les gènes localisés sur le chromosome XII et transcrits par la pol II. En revanche, la délétion de l'ADNr a un effet sur la transcription des gènes adjacents (Wai *et al.*, 2000). Nous avons observé une forte induction des gènes flanquants l'ADNr. Cependant, cet effet ne se produit que sur quelques kilobases. Les autres gènes ne sont pas affectés. Notons toutefois qu'à droite de ce locus, se trouve 4 copies d'un gène *ASP3*. Leurs séquences nucléotidiques sont quasiment identiques. Il est donc normal que toutes soit induites. Ceci indique donc que la présence et la transcription de l'ADNr sur le chromosome XII a une incidence sur la transcription par l'ARN polymérase II des gènes adjacents. Elle est apparemment responsable d'une répression de la transcription des gènes situés de part et d'autres. L'effet observé est polaire mais s'éteint très rapidement et brusquement.

V. Discussion

V.1. Sensibilités du mutant *rsc4-myc*

Nous avons isolé un mutant thermosensible de la sous-unité Rsc4 du complexe RSC. En plus de la thermosensibilité à 37°C, le mutant *rsc4-myc* présente aussi d'autres phénotypes de croissance. Il est notamment sensible à la formamide, la caféine, le bénomyl et le chlorure de sodium. Ceci le rapproche des mutants de *RSC3*, *RSC30* et *STH1* (Angus-Hill *et al.*, 2001 ; Chai *et al.*, 2002). Toutefois la thermosensibilité de ces mutants est supprimée par le sorbitol. La voie des MAP kinases, à laquelle participe la protéine kinase C Pkc1 (voie PKC), est impliquée dans le maintien de l'intégrité de la paroi et du cytosquelette (pour revue, voir Gustin *et*

al., 1998). Une connexion entre la voie PKC et le complexe RSC a été établie récemment (Chai *et al.*, 2002 ; Damelin *et al.*, 2002). Le complexe RSC agirait dans une voie parallèle à celle de la protéine Pkc1 (Chai *et al.*, 2002). Ce lien est concordant avec les défauts transcriptionnels observés pour des gènes de paroi dans les mutants des sous-unités Rsc3, Rsc30 et Rsc9 (Angus-Hill *et al.*, 2001 ; Chai *et al.*, 2002 ; Damelin *et al.*, 2002). Contrairement aux autres mutants de RSC, le mutant *rsc4-myc* n'est pas capable de pousser à température restrictive même en présence de sorbitol. Il est donc possible que cette voie alternative soit perturbée dans le mutant *rsc4-myc*, mais sans être le seul déterminant de la sensibilité du mutant aux chocs osmotiques et à la caféine.

Le mutant *rsc4-myc* présente comme le mutant *sth1-3ts* une sensibilité au benomyl. La mutation *sth1-3ts* influe sur la structure chromatinienne des centromères et provoque des défauts de ségrégations des chromosomes (Du *et al.*, 1998 ; Hsu and Laurent, 2002). Hsu et Laurent ont montré que le complexe RSC interagit avec les composants du kinétochore (Hsu and Laurent, 2002). Ces auteurs ont proposé que RSC est nécessaire à l'établissement et/ou au maintien d'une structure chromatinienne centromérique nécessaire à la transmission des chromosomes. Il est donc possible que la sensibilité du mutant *rsc4-myc* soit liée à une altération du fonctionnement du complexe RSC mutant au niveau des centromères et du kinétochore. Les effets des mutations du complexe RSC sur le fonctionnement du kinétochore pourrait également être dûs à la dérégulation de la transcription de certains gènes.

A la lumière des dernières données publiées sur les fonctions du complexe, il serait intéressant de tester les interactions génétiques entre les voies des MAP kinases et *RSC4* et d'analyser la ségrégation mitotique des chromosomes.

V.2. Transcription par les ARN polymérases I et III.

Nous avons analysé la transcription par la pol I et la pol III dans les mutants *rsc1-Δ* et *rsc4-myc*. Le marquage à l'uracile tritié des ARN néosynthétisés ne nous a pas permis de mettre en évidence des défauts de transcription par la pol I ou la pol III dans le mutant *rsc1-Δ*. Un défaut de transcription a en revanche été observé dans un mutant *rsc2-Δ* (H. Dumay, communication personnelle). Les sous-unités Rsc1 et Rsc2 appartiennent à deux formes différentes du complexe RSC. L'isoforme contenant la protéine Rsc2 est plus abondante. Les protéines Rsc1 et Rsc2 sont partiellement redondantes mais ont chacune des fonctions spécifiques (Cairns *et al.*, 1999). L'absence de défaut transcriptionnel pol I et pol III dans la souche *rsc1-Δ* pourrait être due à une compensation par l'autre forme du complexe. L'existence de défauts transcritionnels dans le mutant *rsc2-Δ* signifierait alors que l'isoforme Rsc1 ne peut pas suppléer la perte de la protéine Rsc2. Alternativement, on peut imaginer que le complexe contenant la protéine Rsc2 ait des fonctions spécifiques dans la transcription par les ARN polymérases I et III que ne possède pas l'autre isoforme.

La délétion du gène *STH1*, encodant la sous-unité catalytique de RSC, est létale. Des expériences, réalisées sur un délétant de *STH1*, montrent que le plasmide permettant la transcription de l'ADNr par la pol II (Nogi *et al.*, 1991) ne permet pas de sauver cette souche (Treich and Carlson, 1997). Ceci indique que s'il intervient dans la transcription par la pol I, le complexe RSC a au moins une autre fonction essentielle. Bien qu'aucune association de l'ADNr n'ait été détectée avec RSC (Ng *et al.*, 2002), certaines mutations du complexe RSC provoquent des défauts dans la synthèse des ARN ribosomiques (H. Dumay, données non publiées ; Damelin *et al.*, 2002).

Le marquage *in vivo* des ARN dans le mutant *rsc4-myc* fait apparaître une très forte baisse de l'incorporation de phosphate radioactif dans les ARN. Ceci est

généralement interprété comme des défauts dans la néosynthèse des ARN. Il est probable que cela soit dû à un problème d'import ou d'utilisation du phosphate. En effet, nous avons observé une diminution de la quantité de phosphate radioactif rentré dans les cellules. De plus, certains des gènes dérégulés (d'un facteur 2 et plus) font partie du métabolisme du phosphate. Cependant, les taux de variations sont faibles et beaucoup de ces gènes sont déjà affectés à 30°C. Ceci ne permet pas complètement d'expliquer la baisse drastique d'incorporation du phosphate. Les ARN de transfert et les ARN 18S et 25S sont extrêmement stables. La stabilité ces ARN obligent donc à observer les quantités présentes de leurs précurseurs. La maturation de ces précurseurs étant rapide, il est peu probable que ceux-ci soient stabilisés plusieurs heures. La surimposition de plusieurs défauts de maturation fait que nos résultats de Northern blot ne peuvent pas être interprétés simplement et ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer un rôle du complexe RSC dans la transcription par l'ARN polymérase I. Toutefois, un arrêt de la transcription se traduirait par une disparition des espèces de la voie de maturation.

Nos données de Northern blot n'indiquent pas de défaut dans la synthèse des ARNt. Les différents gènes d'ARN de transfert ont plusieurs copies dans le génome. À l'intérieur d'une famille, ces copies ont des séquences très similaires et les transcrits correspondants sont de ce fait très difficilement discernables par des techniques d'hybridation. De plus, on ne sait pas si toutes les copies sont transcrites de manière équivalente. Il est possible que la redondance entre ces gènes entraîne des phénomènes de compensation. Ceci pourrait expliquer que nous n'observions pas de différence. Nous n'avons pas observé de différence quantitative pour les formes matures des ARN U6 et SCR1. La présence de RSC dans les régions en amont des gènes transcrits par l'ARN polymérase III ainsi que la co-immunoprécipitation de ces deux complexes suggèrent néanmoins fortement l'existence d'une relation fonctionnelle (Ng *et al.*, 2002). Des travaux réalisés au laboratoire par O. Lefebvre vont dans ce sens. La transcription du gène *SNR6* (codant l'ARN U6) est dépendante de la structure nucléosomale (Burnol *et al.*, 1993 ; Marsolier *et al.*, 1995). Il existe des

matrices modifiées de ce gène (maxi U6) dans lesquelles une insertion de 59 pb a été faite dans la séquence transcrite. Ces gènes chimériques sont placés sur des plasmides multicopies. Les produits de ces matrices modifiées sont différenciables de ceux du gène SNR6 endogène. La mutation *rsc4-myc* provoque après 7 heures de culture à 37°C une baisse de la transcription de ces gènes maxi U6 (O. Lefebvre, communication personnelle). Bien que l'on ne puisse pas exclure que l'effet observé soit dû à une instabilité des ARN maxiU6, l'explication la plus simple serait que la transcription de ces gènes chimériques est altérée. O. Lefebvre a également observé des effets sur la transcription du gène *RPR1*, codant l'ARN de la RNase P. La transcription de ce gène est diminuée à 37°C dans le mutant *rsc4-myc*. En conclusion, bien que nous n'ayons pas observé de défauts pour des ARNt, SCR1 et SNR6, ces données indiquent qu'il pourrait y avoir une action de RSC sur la transcription de certains gènes par l'ARN polymérase III.

V.3. Effet sur le transcriptome

Les gènes dont la transcription est dérégulée par la mutation *rsc4-myc* se différencient de ceux affectés par les autres mutations dans le complexe RSC (Angus-Hill *et al.*, 2001 ; Damelin *et al.*, 2002). Nous observons une dérégulation de gènes impliqués dans la biogénèse de la paroi. Par contre, les autres groupes fonctionnels, comme les gènes encodant les protéines ribosomiques, dérégulés par d'autres mutations dans RSC ne sont pas affectés. Une explication serait que la mutation *rsc4-myc* n'affecte pas le recrutement ou le fonctionnement du complexe au niveau de ces promoteurs. Un modèle actuel pour le fonctionnement du complexe RSC est celui d'un cœur catalytique entouré par un certain nombre de sous-unités régulatrices. Les données d'analyse de transcriptome semblent valider ce modèle en indiquant une spécialisation des sous-unités dans le ciblage du complexe vers différents promoteurs.

Le passage à température restrictive ne bouleverse pas profondément la transcription par l'ARN polymérase II. Il est donc possible que la thermosensibilité du mutant *rsc4-myc* ne soit pas due à un effet transcriptionnel sur la pol II mais à l'altération d'une autre fonction de RSC. La perturbation des transcriptions par les ARN polymérases I et III pourrait être responsable de cette thermosensibilité. Nous n'avons toutefois pas pu établir clairement l'effet de cette mutation sur la transcription des ARNr et ARNt. De plus, la transcription par l'ARN polymérase I, si elle nécessite l'intervention de RSC, n'est pas l'unique cause du caractère essentiel de RSC (Treich and Carlson, 1997). Il se pourrait donc qu'une autre fonction de RSC soit affectée et responsable de la thermosensibilité du mutant *rsc4-myc*. Au vu des données récentes sur le rôle du complexe RSC et des sensibilités de ce mutant aux chocs osmotiques et au benomyl, il serait intéressant de tester ces autres fonctions (voie PKC, ségrégation des chromosomes).

V.4. Quelles explications pour l'induction transcriptionnelle des gènes du chromosome XII ?

L'induction transcriptionnelle du chromosome XII, qui porte les gènes d'ADNr ribosomiques, n'est pas liée à une aneuploïdie de ce chromosome. Les copies d'ADNr sont localisées sur ce chromosome. De plus, les copies transcriptionnellement actives d'ADNr sont dépourvues de nucléosomes. Nous avons posé une hypothèse selon laquelle le complexe RSC collabore avec la pol I pour permettre le déblaiement des copies actives. Dans le mutant *rsc4-myc*, cette coopération serait moins efficace et entraînerait un réenvahissement partiel de l'ADNr permettant ainsi l'activation transcriptionnelle des gènes pol II. Dans ce modèle, on s'attend à un effet polaire à partir des bornes de l'ADNr, or ceci ne semble pas être le cas. L'analyse du transcriptome d'une souche de levure dans laquelle l'ADNr est délété sur le chromosome XII (Wai *et al.*, 2000) indique une stimulation des gènes situés de chaque côté du locus de l'ADNr sur environ 14 kb à gauche et 30 kb à droite de la délétion. L'effet n'est plus sensible au-delà de ces distances. La transcription de l'ADNr au

locus semble responsable d'une répression des gènes adjacents. Pour tester notre modèle, nous avons introduit la mutation *rsc4-myc* dans les souches NOY505 (Nogi *et al.*, 1993), NOY891 (Wai *et al.*, 2000) et CY215 (Christman *et al.*, 1993). La souche NOY891 dérive de la souche NOY505 par une délétion complète de l'ADNr sur le chromosome XII. Cette délétion est complétée par un plasmide multicopies portant les séquences codant l'ARN 5S, transcrit par la pol III, et l'ARN 35S, transcrit par la pol II à partir d'un promoteur *GAL* inductible (Wai *et al.*, 2000). Dans la souche CY215, environ 50 copies d'ADNr ont été placées sur le chromosome III par recombinaison au locus *LEU2* (Christman *et al.*, 1993). La mutation *rsc4-myc* a été introduite dans ces souches par amplification et intégration au locus de la cassette présente dans la souche MW3461. Comme dans la souche YPH499, cette mutation induit un phénotype thermosensible dans les souches NOY505, NOY891 et CY215. Si le profil d'expression particulier du mutant *rsc4-myc* est lié à la transcription de l'ADNr sur le chromosome alors, la délétion des gènes d'ADNr sur le chromosome XII devrait supprimer cet effet. Réciproquement, l'insertion de copies d'ADNr ribosomiques dans le chromosome III devrait induire un profil similaire pour ce chromosome. Or, l'introduction de la mutation *rsc4-myc* n'a pas d'incidence particulière sur le profil d'expression des gènes du chromosome XII dans les souches dérivées de NOY505 et CY215. Ces souches ayant des fonds génétiques différents de celui de la souche YPH499, l'absence d'effet sur la transcription des gènes portés par le chromosome XII pourrait s'expliquer par un effet dépendant du fond génétique. Des contrôles supplémentaires sont en cours afin de confirmer ces résultats. La délétion de l'ADNr dans le fond génétique de la souche YPH499 et la conjugaison de cette délétion avec la mutation *rsc4-myc* permettrait d'éclairer les mécanismes impliqués dans ce phénomène. Si cette hypothèse se vérifie, d'autres gènes devraient être impliqués. Il sera alors intéressant d'identifier les déterminants de la spécificité du fond génétique.

Des études chez les eucaryotes supérieurs ont montré que la transcription d'un gène est en partie dépendante de sa localisation dans l'espace nucléaire. La

transcription d'un gène peut être influencée par la distance par rapport au centre du noyau mais également par l'environnement chromatinien (revue dans Cremer and Cremer, 2001 ; Dundr and Misteli, 2001). Peu de travaux concernant l'architecture nucléaire ont été réalisés chez la levure notamment du fait de la taille réduite des organites et des problèmes de résolution qui en découlent. Il ne semble pas y avoir d'organisation en territoires chromosomiques bien définis chez cet organisme. la position du chromosome XII dans le noyau. La partie chromosome correspondant à l'ADNr est dans le nucléole, mais on ne sait pas comment s'organise le reste du chromosome par rapport à ce corps nucléaire. La détection par immunofluorescence du nucléole du mutant *rsc4-myc* ne fait pas apparaître de défauts morphologiques flagrants (B. Guglielmi, communication personnelle). On peut proposer que, dans le mutant *rsc4-myc*, la localisation du chromosome XII dans le noyau est modifiée. Ceci aurait pour conséquence de "déréprimer" légèrement la transcription des gènes situés sur le chromosome XII. Cet effet pourrait être indirect et/ou être dû à la dérégulation de la transcription de certains gènes déterminants pour la localisation du chromosome.

V.5. Comparaison avec les données d'immunoprécipitation de chromatine.

Dans deux études indépendantes, les sites de liaison intergéniques du complexe RSC ont été déterminés par immunoprécipitation de chromatine (ChIP ; IV.2.3 ; (Damelin *et al.*, 2002 ; Ng *et al.*, 2002). Leurs résultats ne sont pas parfaitement concordants. Toutefois les auteurs ont fait part d'une difficulté à ponter le complexe RSC à l'ADN, ce qui les a contraint à réaliser un traitement statistique. Cette difficulté expérimentale pourrait expliquer les divergences entre les deux études.

Nous avons comparé nos résultats d'analyse par puces à ADN avec les travaux décrits par Ng et collaborateurs (Ng *et al.*, 2002). Les gènes dont la quantité de transcrit varie d'un facteur 2 et plus ont été recherchés parmi les cibles (régions promotrices) du complexe RSC identifiées par cette étude (figure 48). Le taux de

recouvrement des deux séries de données est approximativement de 10 %. La répartition des sites de liaison de RSC sur les différents chromosomes n'est pas statistiquement différente de la répartition aléatoire théorique ($\chi^2 = 4$ pour une valeur de rejet de 25). Il n'y a donc pas de préférence chromosomique statistique dans la localisation des sites de liaison du complexe RSC. Toutefois, on note que la répartition n'est pas tout à fait homogène et que certaines zones sont dépourvues de cibles (figure 48). Il pourrait donc y avoir un léger biais de répartition intrachromosomique. On peut penser que les gènes communs aux deux études sont des cibles véritables du complexe RSC. De façon intéressante, le chromosome XII est celui pour lequel le recouvrement des deux jeux de données est le meilleur.

Comment expliquer le faible taux de recoupement entre les résultats d'analyse de transcriptome et d'immunoprécipitation de chromatine ? La technique de ChIP détermine les sites de liaisons du complexe RSC. La présence du complexe dans une région promotrice en amont d'une phase ouverte de lecture suggère que la transcription du gène correspondant peut éventuellement être contrôlée par RSC. Toutefois, cela ne signifie pas forcément qu'une mutation spécifique dans une sous-unité particulière du complexe aura des répercussions sur la transcription de ce gène. Enfin, la ChIP ne permet pas de prédire les effets indirects en cascade sur la transcription de gènes qui sont affectés par les produits de gènes cibles de RSC. Une autre explication peut être avancée. Le complexe RSC est essentiel à la viabilité cellulaire. Certaines de ses fonctions ne peuvent donc pas être assurées par d'autres facteurs. Nous n'avons pas constaté de recouvrement important entre les gènes dérégulés par la mutation *rsc4-myc* et par les mutations dans le complexe SWI/SNF. Ceci indique que ces deux complexes ne sont pas entièrement redondants mais il est néanmoins possible que le complexe SWI/SNF supplée partiellement la déficience de RSC. La redondance de RSC avec un ou plusieurs autres complexes pourrait également expliquer faible recouvrement des gènes dérégulés et des cibles potentielles.

Nous observons une dérégulation de nombreux gènes sur le chromosome XII. Bien que le recouvrement entre les sites de liaison intergéniques de RSC et les gènes dérégulés soit concentré sur le chromosome XII, il n'apparaît pas d'interaction préférentielle par immunoprécipitation de chromatine de RSC avec ce chromosome. L'effet observé sur ce chromosome ne semble donc pas résulter d'un contrôle transcriptionnel direct de ces gènes RSC.

La dérégulation transcriptionnelle de certains gènes dans le mutant *rsc4-myc* et l'identification d'un site de liaison de RSC dans une région intergénique adjacente suggèrent très fortement que l'expression de ces gènes est contrôlée, en partie tout au moins, par RSC (tableau VIII). La présence côte à côte de deux de ces gènes soulève la question de l'existence de groupes de régulation (clusters). Nous avons isolé trois clusters potentiels. Il s'agit de YLL019C (*KNS1*)/YLL020C, YLR120C (*YPS1*)/YLL120C (*YPS3*) et YLR348C (*DIC1*)/YLR350W (*ORM2*). Les gènes des deux premiers groupes sont transcrits sur le même brin, ceux du dernier sur des brins complémentaires. Seul le couple YLR120C/YLR121C fait apparaître un lien fonctionnel clair. Ces deux gènes encodent des protéases aspartiques de séquences protéiques similaires. Néanmoins cette similitude n'est pas retrouvée au niveau nucléotidique, ce qui exclut par conséquent une hybridation croisée.

Perspectives...

Ce travail a été principalement consacré à l'étude de la transcription dans un mutant du complexe de remodelage de la chromatine RSC. Plusieurs complexes de ce type ont été découverts chez la levure. RSC appartient à la famille de type SWI/SNF. Toutefois la particularité de ce complexe est qu'il est, contrairement aux autres complexes de ce type connus à ce jour, essentiel pour la viabilité cellulaire. D'autre part, RSC est beaucoup plus abondant que le complexe homologue SWI/SNF. Ceci soulève la question de savoir ce qui différencie le complexe RSC des autres complexes de remodelage. Quelle est la fonction spécifique de RSC qui ne peut pas être prise en charge par d'autres complexes ? Pourquoi est-il aussi abondant ? Bien que nous ayons tenté de répondre à ces questions, elles restent encore à ce jour très ouvertes.

Un rôle général dans la transcription ?

La transcription s'effectue *in vivo* sur des matrices qui conservent une structure nucléosomale. Les complexes de remodelage jouent un rôle fondamental dans la régulation de la transcription en maintenant et en modulant cette structure. Nous avons établi l'existence d'interactions entre les ARN polymérases et le complexe RSC. Ceci nous a conduit à proposer que le complexe RSC soit impliqué dans la régulation de la transcription. Au moment où nous avons démarré ce projet, l'intervention du complexe RSC avait été démontrée dans le cas du gène *CHA1*. Aucun lien avec la transcription par la pol I et la pol III n'avait été établi. Des interactions entre machineries de remodelage et la pol I ou la pol II ont été montrées (Wilson *et al.*, 1996 ; Strohner *et al.*, 2001). Par contre, aucune interaction entre la pol III et un complexe de remodelage n'a été publiée à ce jour. Notre mutant ne nous a malheureusement pas permis de répondre à la question du rôle de RSC dans la transcription des gènes de classe I et III. La co-immunoprécipitation entre l'ARN polymérase III et le complexe RSC ainsi que l'association privilégiée du complexe

RSC avec les régions situées amont des gènes d'ARNt sont donc les premiers arguments d'un recrutement d'un complexe de remodelage de la chromatine pour la transcription de classe III. D'autres données du laboratoire indiquent que certains ARN transcrits par la pol III sont affectés dans ce mutant. Il serait intéressant de poursuivre la caractérisation de l'effet de cette mutation. L'analyse des autres fonctions connues de RSC apporterait également des renseignements sur l'origine des défauts de croissance de ce mutant.

L'origine du comportement du chromosome XII reste à déterminer.

Notre étude par puces à ADN a révélé un profil transcriptionnel particulier dans le mutant *rsc4-myc*. L'induction transcriptionnelle préférentielle des gènes d'un chromosome n'a pas été décrite à ce jour. Il semble que ce phénomène ne soit pas lié à une disomie du chromosome XII. Bien que l'origine de ce comportement n'a pas été élucidée, nous proposons que celui-ci soit lié à la transcription pol I. En effet, la coïncidence de ce profil transcriptionnel avec la présence de l'ADNr sur ce chromosome est particulièrement troublante. Nous avons également proposé que la mutation *rsc4-myc* puisse provoquer un changement de localisation du chromosome XII. Nous n'avons cependant pas à l'heure actuelle d'argument pour étayer cette hypothèse. Même si ce modèle impliquant l'ADNr n'est pas parfaitement satisfaisant (on attend alors un effet polaire), il garde notre faveur. Nos tentatives pour montrer un effet conjoint de la transcription pol I et de la mutation *rsc4-myc* sont restées infructueuses. Il se pourrait néanmoins qu'il existe une composante liée au fond génétique des souches utilisées. Le sujet a été repris au laboratoire par G. Gendrel. Nous envisageons dans les mois à venir de conjuguer des délétions de l'ADNr et la mutation *rsc4-myc* dans le fond génétique que nous utilisons couramment. Il sera également important d'essayer de confirmer les résultats que nous avons obtenus avec d'autres mutants de la protéine Rsc4. Il n'y a pour autant aucune certitude que deux mutants de *RSC4* se comportent de la même manière. G. Gendrel a réalisé des

délétions successives à partir de la région carboxy-terminale. Ceci lui a permis de montrer que la délétion des 3 derniers résidus de la protéine Rsc4 (*rsc4-Δ3*) entraîne un phénotype de croissance similaire à celui observé pour le mutant *rsc4-myc*. Toutefois ce mutant n'est pas sensible aux différentes substances (caféine, chlorure de sodium, formamide, bénomyl) qui aggravent le phénotype de croissance du mutant *rsc4-myc*. L'analyse du transcriptome du mutant *rsc4-Δ3* par puces à ADN va être effectuée prochainement. Il sera donc intéressant de voir si le profil transcriptionnel particulier du mutant *rsc4-myc* sera reproduit. Compte tenu du fait que le mutant *rsc4-Δ3* n'a pas les sensibilités trouvées chez les autres mutants de RSC et notamment chez le mutant *rsc4-myc*, cette analyse pourrait permettre de savoir si ces sensibilités sont la résultante des défauts de transcriptionnels observés.

Qu'en est-il de l'ordre de recrutement ?

Des modèles séquentiels de recrutement des activités de remodelage de la chromatine et de l'appareil transcriptionnel fondés sur des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été proposés (Cosma *et al.*, 1999 ; Agalioti *et al.*, 2000 ; Reinke *et al.*, 2001 ; figures 21 et 22 dans le chapitre IV.5 de l'introduction). Ces modèles prédisent, d'une part, les complexes de modification des histones et de remodelage de la chromatine peuvent avoir des actions séquentielles (les deux ordres sont possibles) ou combinées et que, d'autre part, la machinerie de transcription peut arriver au promoteur avant la fin du remodelage de la chromatine (Agalioti *et al.*, 2000). D'autre part, les modèles de recrutement holoenzymatiques suggèrent que les deux machineries peuvent arriver simultanément sur le promoteur (Wilson *et al.*, 1996). Toutefois, le complexe RSC n'est pas été copurifié avec l'ARN polymérase II (Cairns *et al.*, 1996) et l'ARN polymérase III (H. Dumay, communication personnelle). Les interactions entre ARN polymérases et RSC ne permettent pas de préjuger de l'ordre de recrutement. Les gènes dérégulés dans le mutant *rsc4-myc* et qui sont désignés comme des cibles du complexe sont de bons

candidats pour l'étude des mécanismes de recrutement. Un des écueils à l'étude de l'ordre de recrutement sera de pouvoir synchroniser les cellules en déclenchant la transcription du gène cible.

Le fait que des facteurs de transcription et les ARN polymérases interagissent en double-hybride avec des composants du complexe RSC suggère que ce dernier pourrait intervenir au niveau des séquences promotrices mais également ponctuellement au cours de l'élongation de la transcription. Notons cependant que nous n'avons pas mis en évidence de sensibilité des mutants *rsc4-myc* et *rsc4-Δ3* à l'acide mycophénolique. De plus, Ng et collaborateurs n'ont pas observé en immunoprécipitation de chromatine d'enrichissement de RSC dans les parties codantes. Ceci suggère donc que RSC n'intervient pas pour faciliter le passage des ARN polymérases en élongation, à moins que ces interactions soient transitoires et donc difficiles à démontrer.

Matériel et Méthodes

Milieux

Les milieux de culture bactériens et de levure sont décrits respectivement dans (Adams *et al.*, 1997 ; Sambrook and Russel, 2001).

Biologie Moléculaire - Manipulation de la levure

Les méthodes classiques de biologie moléculaire et de manipulation de la levure sont décrites dans (Sambrook and Russel, 2001) et (Adams *et al.*, 1997).

Les conditions standard de PCR sont : 1µM de chaque oligonucléotide, 0,2mM de chaque dNTP, 5U de Taq polymérase dans 50 µl. Le cycle de base est 94°C (3 minutes) puis 25 fois le cycle dénaturation à 94°C (30 secondes), hybridation des amorces (30 secondes), élongation 72°C (1 minute par kb). Une étape de 7 minutes à 72°C est rajoutée après les 25 cycles d'amplification. La température d'hybridation des oligonucléotides est adaptée en fonction de chaque couple d'amorce.

Construction des souches

Les souches de levure et les plasmides qui ont été utilisés et construits sont indiqués dans les tableaux IX et X.

1-Constructions des allèles mutés de *RPC160*

Les coordonnées sont données à partir du +1 de la phase ouverte de lecture du gène recombinant *rpc160-240* (Dieci *et al.*, 1995). La région d'interaction est encadrée par un site *ClaI* (3834) et un site *NheI* (4263). Un autre site *NheI* est présent dans le plasmide pC160-240 en position 8810. Ce site a été éliminé par mutagenèse à l'aide des oligonucléotides 5' GACCC GATTC TTGTT AGCCT TTTCT CGGTC 3' et 5'GACCG AGAAA AGGCT AACAA GAATC GGGTC3'. Le plasmide pC160-240 a été digéré par les enzymes *ClaI* et *NheI* de façon à éliminer la région d'interaction de C160 avec ABC27. La mutagenèse a été réalisée par PCR en utilisant le taux d'erreur spontanée de la Taq polymérase (la PCR a été faite sans manganèse et avec des quantités équivalentes de chaque nucléotide ; le taux d'erreur moyen de la Taq polymérase est d'environ 2.10^{-4}). Le fragment *ClaI-NheI* a été amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides 5' CGCGG TTGCT ATAAC CAGGG CTTC 3' et 5' CCGGT ACCGA TCGAC ATCGT TTGAC CC 3'. Ces oligonucléotides s'hybrident respectivement 111 et 122 nucléotides de part et d'autre des sites *ClaI* et *NheI*. La souche MW636 (contenant le gène *RPC160* sur le plasmide centromérique pC160-6) est transformée simultanément par le fragment de PCR et le plasmide pC160-240 linéarisé. Les nouveaux allèles de *RPC160* sont obtenus par un double événement de recombinaison *in vivo* entre le plasmide pC160-240 linéarisé et le fragment de PCR. Le plasmide pC160-6 est contre-sélectionné sur un milieu contenant du 5-FOA.

2-Construction des souches étiquetées HA et Myc.

Les étiquettes HA et Myc ont été insérées en position C-terminale (Longtine *et al.*, 1998). Les gènes recombinants ont été créés par recombinaison *in vivo* avec un

produit PCR commençant juste en 5' du codon stop du gène. Ce produit de PCR contient la séquence encodant les épitopes, un terminateur de transcription ainsi qu'un marqueur d'intégration. Les oligonucléotides utilisés contiennent environ 50 bases correspondant aux nucléotides flanquant le site d'intégration (tableau XI). Les marqueurs d'intégration qui ont été utilisés sont *TRP1*, *HIS5* (de *S. pombe* complétant la délétion du gène *HIS3* de *S. cerevisiae*) ou *KAN*. Dans le cas du marqueur *KAN*, une incubation supplémentaire de 3 heures en YPD a été réalisée avant d'étaler les transformants pour permettre l'expression du gène de résistance à la généticine (20 µg/µl).

La protéine Rsc4 a également été étiquetée par 13 épitopes Myc dans les souches NOY505 (Nogi *et al.*, 1993), NOY 891 (Wai *et al.*, 2000) et CY215 (Christman *et al.*, 1993). Pour cela, la cassette intégrée dans la souche MW3461 a été amplifiée à l'aide des oligonucléotides sens 5' TCTCCT TCATG TTACA ACC 3' et 5' GGAAG CAAGG CTCGT TGTCG 3'. Ces oligonucléotides permettent d'amplifier la cassette flanquée de 383 et 484 pb respectivement en 5' et 3'.

L'intégration des cassettes a été vérifiée par PCR et l'expression des protéines de fusion a été contrôlée par western blot en utilisant des anticorps 12CA5 (anti-HA) ou 9E10 (anti-Myc).

3-Plasmides

Le fragment 3503-4319 des allèles mutés de *rpc160-240* (voir 1-) a été amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides 5' CTCGG ATCCC TTCCA AGGTC ATTTC TACAC 3' et 5' GAGCT CGAGC ATATA AAAGG CCGCA TCG 3' et cloné dans le vecteur pACT aux sites *Bam*HI *Xho*I.

Le plasmide pACT-Rsc4(558-625)-13Myc a été obtenu par insertion d'un fragment de PCR contenant les résidus 558-625 de *RSC4* et les treize épitopes Myc

dans le vecteur pACT aux sites *NcoI* *Bam*HI après remplissage avec le fragement de klenow du site *Bam*HI. L'amplification PCR a été faite sur l'ADN génomique de la souche MW3461 à l'aide des oligonucléotides 5' CTCCA GCCAT GGAGT GAAGT CTAGA ACTTC AATGT AAAC 3' et 5' GAGAT GCTGG AGGAA AGCAA CCTGA CCTAC AGG3'.

Immunoprécipitation des ARN polymérases

1- Préparation des extraits et immunoprécipitation de l'ARN polymérase III.

Les souches (sauvage et mutante) sont cultivées en phase exponentielle. 200 ml de culture sont récoltés par centrifugation (DO_{600nm} 0,7-0,8). Le culot cellulaire est lavé à l'eau puis avec du tampon d'immunoprécipitation (Hépès 20 mM pH7,5, EDTA 0,5 mM, NaCl 100 mM, DTT 1mM, glycérol 20 %). Les cellules sont ensuite broyées avec des billes de verre dans du tampon d'immunoprécipitation additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche). Pour tester la stabilité à la chaleur des ARN polymérases III mutantes, les extraits sont incubés pendant 40 minutes à 45°C avant de faire l'immunoprécipitation.

8.10⁶ billes magnétiques Dynabeads M450 (Dyna) sont lavées 2 fois avec du PBS-0,1%BSA. On ajoute 1,2 µg d'anticorps anti-HA 12CA5 purifiés pendant 30 minutes à 4°C en agitant. Après 2 lavages de 5 minutes en PBS-0,1 % BSA, les billes sont rapidement rincées avec du tampon d'immunoprécipitation contenant 0,05 % de NP40. 300 µg de protéines totales sont incubées avec les billes pendant 3 heures à 4°C sous agitation. Ces dernières sont alors lavées 3 fois 5 minutes avec du tampon contenant 0,05 % de NP40. Les protéines sont décrochées par ébullition et séparées par gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

2-Préparation des extraits bruts et immunoprécipitation de l'ARN polymérase avec RSC

Les cellules sont cultivées en phase exponentielle. 500 ml de culture (DO_{600nm} 0,7-0,8) sont récoltés par centrifugation. Les cellules sont lavées deux fois à l'eau et avec du tampon de lyse (Hépès pH 7,5 50 mM, CH₃COOK 50 mM, DTT 1 mM, glycérol 10 %). Les cellules sont broyées à l'aide d'une presse d'Eaton dans du tampon de lyse contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases (Complete, Roche) et 3mM de Phénylméthylsulfoxyde (PMSF). On ajoute de l'acétate de potassium à une

concentration de 450mM et on centrifuge 1 h à 40k rpm à 4°C (rotor Beckmann 50.2 Ti). Le surnageant est précipité avec 30 % de sulfate d'ammonium et centrifugé 30 minutes à 40k rpm à 4°C. Le culot est ensuite resuspendu dans 5 % du volume initial dans du tampon d'immunoprécipitation (Hépès 20 mM, EDTA 0,5 mM, NaCl 100 mM, DTT 1mM, glycérol 20 %) et dialysé contre ce même tampon.

8.10⁶ billes magnétiques Dynabeads M450 (Dyna) sont rapidement lavées 2 fois avec 1,25 volume de PBS-BSA 0,1 % et incubées 30 minutes dans 1 volume de PBS-0,5 % lait (écrémé déshydraté) à 10°C en agitant. On ajoute 1,2 µg d'anticorps anti-HA 12CA5 (60 ng/µl) pendant 30 minutes sous agitation à 10°C. Les billes sont lavées 3 fois 5 minutes avec 2 volumes de PBS-0,5 % lait sous agitation à 10°C puis 2 fois rapidement dans 2 volumes de tampon d'immunoprécipitation avec 0,05 % de NP40. 1,5 mg d'extrait brut (environ 15 µg/µl final) est incubé avec 0,05 % de NP40 pendant 3 heures (10°C sous agitation). Les billes sont lavées 3 fois 5 minutes avec 4 volumes de tampon d'immunoprécipitation et 0,05 % de NP40 sous agitation à 10°C. Les protéines retenues sont éluées par compétition avec 16 µl de tampon d'immunoprécipitation contenant 0,05 % de NP40 et 0,1 µg/µl de peptide HA PB250. Les protéines sont ensuite séparées sur gel de polyacrylamide et révélées par Northern blot. Les épitopes HA et Myc sont respectivement reconnus par les anticorps 12CA5 et 9E10.

Marquage des ARN au ³³P

Le protocole est adapté de Rubin, (1975). Brièvement, les cellules sont cultivées en phase exponentielle en YPD sans phosphate (YPD*) à 30°C jusqu'à une DO_{600nm} de 0,3-0,5. L'équivalent de 5 ml de cellules à DO_{600nm} 0,4 est récolté et repris dans 5 ml YPD* préchauffé. Les cellules sont incubées 10 minutes en présence de 250 µCi de ³³PO₄⁻ inorganique. L'incorporation de phosphate est stoppée en diluant les cellules

dans 20 ml d'eau glacée. Les cellules sont centrifugées 10 minutes à 4°C et 6000 rpm puis lavées avec 1 ml d'eau froide. Le culot cellulaire peut être congelé si on ne procède pas immédiatement à l'extraction des ARN.

Composition du YPD* = YPD sans phosphate inorganique (Rubin, 1975) : le YPD* est préparé à partir de un litre d'YPD auquel on ajoute 10 ml de MgSO_4 1 M et 10 ml de NH_4OH concentré. La précipitation des phosphates s'effectue sous agitation pendant 30 minutes. Le précipité est éliminé par deux filtrations successives (0,45 μm). Le pH du milieu est ajusté à 5,8 avec de l'acide chlorhydrique concentré avant d'autoclaver. Le glucose est ajouté extemporanément à une concentration de 18g/l.

Les ARN sont extraits par la méthode du phénol chaud (Briand *et al.*, 2001a). Le culot cellulaire est repris dans 500 μl de tampon AE (50 mM Acétate de sodium pH 5.3, 10 mM EDTA). On ajoute ensuite 1 % de SDS (vortexer pour mélanger), 500 μl de phénol acide (tamponné avec du tampon AE pH5,3 et additionné de 0,1 % de 8-hydroxyquinoline) préchauffé à 65°C et des billes de verre. Pour lyser les cellules on incube 1 minute à 65°C et on vortexe ensuite 2 minutes. Ce cycle est répété deux autres fois. Le mélange est congelé dans un mélange éthanol-carboglace puis décongelé à 65°C. Cette procédure est répétée une deuxième fois. Le mélange est centrifugé au froid pendant 20 minutes à 15 000g. Une deuxième extraction des ARN est faite sur la phase aqueuse avec du Phénol/Dichlorométhane/Alcool isoamylique acide (PDI, en proportion 25:24:1). Les ARN sont précipités avec du LiCl (2M) et de l'éthanol froid pendant 1 heure à -80°C. Les tubes sont centrifugés 20 minutes à 4°C à 15 000 g. Le culot d'ARN doit être rincé plusieurs fois avec de l'éthanol 70 % puis séché et repris dans l'eau.

Les ARN totaux (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sont ensuite traités pendant 2 heures à 37°C avec 5U/ μg de phosphatase alcaline (*New England Biolabs*) pour dégrader les polyphosphates. Pour éliminer l'enzyme, les ARN sont extraits avec du PDI et précipités comme précédemment au LiCl. Les différentes espèces d'ARN sont séparées par migration sur gel d'acrylamide ou d'agarose dénaturant.

Marquage des ARN à l'uracile tritié

Le protocole est extrait de Stettler *et al.*, (1992). Brièvement, les souches doivent être prototrophes pour l'uracile. Les cellules sont cultivées en absence d'uracile en phase exponentielle ($0,3 < DO_{600nm} < 0,5$). L'équivalent de 5 ml à DO_{600nm} 0,4 est centrifugé et repris dans 5 ml de milieu préchauffés. On ajoute 250 μ Ci d'uracile tritié et on incube les cellules pendant 10 minutes. L'incorporation est arrêtée avec 20 ml d'eau glacée. Les cellules sont récoltées par centrifugation pendant 10 minutes à 6k rpm à 4°C puis lavées à l'eau froide une seconde fois. Les cellules peuvent être congelées si on ne procède pas immédiatement à l'extraction des ARN. L'extraction est faite selon le protocole décrit dans le paragraphe marquage des ARN au [33 P].

Northern blot

Les ARN totaux sont séparés sur gel de polyacrylamide ou d'agarose dénaturant et transférés sur membrane de nylon comme décrit par Briand *et al.*, (2001a). Les séquences nucléotidiques des sondes sont données dans le tableau XII. Les sondes sont phosphorylées avec du [γ - 32 P] ATP et de la T4 Polynucléotide kinase en suivant le protocole de Torchet *et al.*, (1998). Avant l'hybridation, les sondes sont purifiées à l'aide d'une colonne de sépharose G-50 (*Amersham Biosciences*) en suivant les recommandations du fabricant.

Coloration double-hybride

La souche Y190 est cotransformée par les plasmides exprimant les fusions avec les domaines de liaison à l'ADN et activateur de Gal4. Les clones sont ensuite repiqués sur milieu sélectif. La coloration est faite en coulant sur les cellules une surcouche d'agar contenant du X-gal. La procédure complète est décrite dans Flores *et al.* (1999).

Hybridation sur puces à ADN

Les ARN Totaux sont extraits à l'aide du kit RNeasy en suivant les recommandations du fabricant (*Qiagen*). Ils sont ensuite précipités à -80°C à l'éthanol en 0,45M acétate de sodium. Les ARN sont centrifugés 30 minutes à 15k rpm à 4°C . Le culot est rincé avec 1 ml d'éthanol 70 % froid puis séché et repris dans l'eau.

20 μg d'ARN totaux sont mélangés avec 5 μg d'oligonucléotide dT₁₂₋₁₈ et chauffés pendant 10 minutes à 70°C . Le mélange est placé sur glace pendant 5 minutes. On ajoute 40 U de RNasin (*Promega*) et on incube 10 minutes à 25°C . Pour synthétiser les ADNc, on ajoute le tampon et le DTT (fournis par *Invitrogen*), 40 U de RNasin, 0,5mM de dATP, dCTP, dGTP, et de dTTP aa-dUTP (proportion 1:2) puis 400 U de Superscript II (*Invitrogen*). La réaction est incubée pendant 1h30 à 42°C . La matrice est ensuite dégradée avec 0,05U/ μl de RNase H (*USB*) et 0,04U/ μl de RNase A (*USB*) pendant 30 minutes à 37°C . L'échantillon est chauffé pendant 15 minutes à 70°C . Les ADNc sont purifiés avec des filtres microcon YM-30 selon les instructions du fabricant (*Millipore*). Les aliquotes de fluorochrome ont été préparées comme

préconisé dans le protocole du laboratoire de P. Brown (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/amino-allyl.html>). Le couplage a lieu dans un volume de 9 µl de carbonate de sodium pH9,0 pendant 1 heure à température ambiante puis est stoppé avec 0,5 volume d'hydroxylamine 4M. Les ADNc marqués sont purifiés sur filtre microcon YM-30 puis précipités à l'éthanol 10 minutes à -80°C en 0,1M NaCl avec 10 µg de poly dA et 0,125 µg/µl de polyacrylamide liquide. Parallèlement, on précipite en 0,2 M NaCl, 10 µg d'ARNt de levure et 10 µg d'ADN de sperme de hareng dénaturé. Les tubes sont centrifugés 15 minutes à 14k rpm à 4°C puis lavés à l'éthanol 80 % dans les mêmes conditions. Les culots sont ensuite séchés à l'air libre. Les ARNt et l'ADN de sperme de hareng sont resuspendus dans 2,5 µl de tampon d'hybridation (50% formamide, 7X SSPE, 5X Denhardt's, 0.5% SDS) par cm² de lamelle, qui servent ensuite à resuspendre les ADNc marqués. Le mélange est dénaturé à 100°C pendant 2 minutes puis placé à 42°C jusqu'à l'hybridation sur la lame.

Les lames sont séchées une heure à 80°C avant d'être réhydratées brièvement avec de la vapeur d'eau et chauffées pendant 4 heures à 80°C. Les sites réactifs de l'aminosilane sont bloqués par un traitement de 20 minutes avec de la N-méthyl-pyrrolidinone contenant 2% d'anhydride succinique et 0,05M de borate de sodium pH8. Les lames sont brièvement rincées avec du SDS 0,1 % puis à l'eau et séchées par centrifugation. Avant d'être hybridée, elles sont incubées pendant 30 minutes à 42°C dans une solution 7X SSPE, 5X Denhart's, 0,5 % SDS, 1 % BSA puis rincées rapidement à l'eau et séchées par centrifugation.

L'hybridation a lieu sur la nuit à 42°C (14 heures au minimum). Les lamelles sont retirées délicatement dans la solution 1 (0,1 % SDS, 0,1X SSC). Les lames sont ensuite lavées pendant 10 minutes dans un nouveau bain de solution 1 puis 2 fois dans la solution 2 (0,1X SSC). Les lames sont séchées par centrifugation et scannées dans la journée.

Références Bibliographiques

A

- Aagaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P.B., Reuter, G. and Jenuwein, T. (1999) Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *Embo J*, **18**, 1923-1938.
- Aasland, R., Stewart, A.F. and 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**, 87-88.
- Abbott, D.W., Ivanova, V.S., Wang, X., Bonner, W.M. and Ausio, J. (2001) Characterization of the stability and folding of H2A.Z chromatin particles: implications for transcriptional activation. *J Biol Chem*, **276**, 41945-41949.
- Adams, A., Gottschling, D., Kaiser, C. and Stearns, T. (1997) *Methods in Yeast Genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T. and Thanos, D. (2000) Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell*, **103**, 667-678.
- Albert, A.C., Denton, M., Kermekchiev, M. and Pikaard, C.S. (1999) Histone acetyltransferase and protein kinase activities copurify with a putative *Xenopus* RNA polymerase I holoenzyme self-sufficient for promoter-dependent transcription. *Mol Cell Biol*, **19**, 796-806.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. (1998) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York.
- Allard, S., Utley, R.T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C.J., Pillus, L., Workman, J.L. and Cote, J. (1999) NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *Embo J*, **18**, 5108-5119.
- Allfrey, V.G., Pogo, B.G., Littau, V.C., Gershey, E.L. and Mirsky, A.E. (1968) Histone acetylation in insect chromosomes. *Science*, **159**, 314-316.
- Allison, D.C. and Nestor, A.L. (1999) Evidence for a relatively random array of human chromosomes on the mitotic ring. *J Cell Biol*, **145**, 1-14.

- Almouzni, G., Mechali, M. and Wolffe, A.P. (1990) Competition between transcription complex assembly and chromatin assembly on replicating DNA. *Embo J*, **9**, 573-582.
- Angus-Hill, M.L., Schlichter, A., Roberts, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Cairns, B.R. (2001) A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Mol Cell*, **7**, 741-751.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E. and Moudrianakis, E.N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10148-10152.
- Aso, T., Shilatfard, A., Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (1996) Transcription syndromes and the role of RNA polymerase II general transcription factors in human disease. *J Clin Invest*, **97**, 1561-1569.
- Awrey, D.E., Weilbaecher, R.G., Hemming, S.A., Orlicky, S.M., Kane, C.M. and Edwards, A.M. (1997) Transcription elongation through DNA arrest sites. A multistep process involving both RNA polymerase II subunit RPB9 and TFIIS. *J Biol Chem*, **272**, 14747-14754.

B

- Ball, L.J., Murzina, N.V., Broadhurst, R.W., Raine, A.R., Archer, S.J., Stott, F.J., Murzin, A.G., Singh, P.B., Dmaille, P.J. and Laue, E.D. (1997) Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *Embo J*, **16**, 2473-2481.
- Ballal, N.R., Kang, Y.J., Olson, M.O. and Busch, H. (1975) Changes in nucleolar proteins and their phosphorylation patterns during liver regeneration. *J Biol Chem*, **250**, 5921-5925.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120-124.
- Barlev, N.A., Candau, R., Wang, L., Darpino, P., Silverman, N. and Berger, S.L. (1995) Characterization of physical interactions of the putative transcriptional adaptor, ADA2, with acidic activation domains and TATA-binding protein. *J Biol Chem*, **270**, 19337-19344.
- Bartholomew, B., Durkovich, D., Kassavetis, G.A. and Geiduschek, E.P. (1993) Orientation and topography of RNA polymerase III in transcription complexes. *Mol Cell Biol*, **13**, 942-952.

- Bartolomei, M.S. and Corden, J.L. (1987) Localization of an alpha-amanitin resistance mutation in the gene encoding the largest subunit of mouse RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **7**, 586-594.
- Bartolomei, M.S. and Corden, J.L. (1995) Clustered alpha-amanitin resistance mutations in mouse. *Mol Gen Genet*, **246**, 778-782.
- Bauer, U.M., Daujat, S., Nielsen, S.J., Nightingale, K. and Kouzarides, T. (2002) Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Rep*, **3**, 39-44.
- Baxeavanis, A.D. and Landsman, D. (1997) Histone and histone fold sequences and structures: a database. *Nucleic Acids Res*, **25**, 272-273.
- Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J. and Woodcock, C.L. (1998) Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14173-14178.
- Belotserkovskaya, R., Sterner, D.E., Deng, M., Sayre, M.H., Lieberman, P.M. and Berger, S.L. (2000) Inhibition of TATA-binding protein function by SAGA subunits Spt3 and Spt8 at Gcn4-activated promoters. *Mol Cell Biol*, **20**, 634-647.
- Berger, S.L. (2001) An embarrassment of niches: the many covalent modifications of histones in transcriptional regulation. *Oncogene*, **20**, 3007-3013.
- Bernstein, B.E., Humphrey, E.L., Erlich, R.L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J.S., Kouzarides, T. and Schreiber, S.L. (2002) Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8695-8700.
- Biggar, S.R. and Crabtree, G.R. (1999) Continuous and widespread roles for the Swi-Snf complex in transcription. *Embo J*, **18**, 2254-2264.
- Bischler, N., Brino, L., Carles, C., Riva, M., Tschochner, H., Mallouh, V. and Schultz, P. (2002) Localization of the yeast RNA polymerase I-specific subunits. *Embo J*, **21**, 4136-4144.
- Boeke, J.D., LaCrute, F. and Fink, G.R. (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet*, **197**, 345-346.
- Bond, U., Agell, N., Haas, A.L., Redman, K. and Schlesinger, M.J. (1988) Ubiquitin in stressed chicken embryo fibroblasts. *J Biol Chem*, **263**, 2384-2388.
- Borden, J. and Manuelidis, L. (1988) Movement of the X chromosome in epilepsy. *Science*, **242**, 1687-1691.
- Bornfleth, H., Edelmann, P., Zink, D., Cremer, T. and Cremer, C. (1999) Quantitative motion analysis of subchromosomal foci in living cells using four-dimensional microscopy. *Biophys J*, **77**, 2871-2886.

- Boumil, R.M. and Lee, J.T. (2001) Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet*, **10**, 2225-2232.
- Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J.M., Mahy, N.L., Ellis, J.A. and Bickmore, W.A. (2001) The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet*, **10**, 211-219.
- Braunstein, M., Sobel, R.E., Allis, C.D., Turner, B.M. and Broach, J.R. (1996) Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol Cell Biol*, **16**, 4349-4356.
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*, **391**, 597-601.
- Bresnick, E.H., Bustin, M., Marsaud, V., Richard-Foy, H. and Hager, G.L. (1992) The transcriptionally-active MMTV promoter is depleted of histone H1. *Nucleic Acids Res*, **20**, 273-278.
- Briand, J.F., Navarro, F., Gadai, O. and Thuriaux, P. (2001a) Cross talk between tRNA and rRNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **21**, 189-195.
- Briand, J.F., Navarro, F., Rematier, P., Boschiero, C., Labarre, S., Werner, M., Shpakovski, G.V. and Thuriaux, P. (2001b) Partners of Rpb8p, a small subunit shared by yeast RNA polymerases I, II and III. *Mol Cell Biol*, **21**, 6056-6065.
- Briggs, S.D., Bryk, M., Strahl, B.D., Cheung, W.L., Davie, J.K., Dent, S.Y., Winston, F. and Allis, C.D. (2001) Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **15**, 3286-3295.
- Brown, C.E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S.C., Carrozza, M.J., Tan, S. and Workman, J.L. (2001) Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science*, **292**, 2333-2337.
- Brown, K.E., Guest, S.S., Smale, S.T., Hahm, K., Merckenschlager, M. and Fisher, A.G. (1997) Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*, **91**, 845-854.
- Brun, I., Sentenac, A. and Werner, M. (1997) Dual role of the C34 subunit of RNA polymerase III in transcription initiation. *Embo J*, **16**, 5730-5741.
- Burlingame, R.W., Love, W.E., Wang, B.C., Hamlin, R., Nguyen, H.X. and Moudrianakis, E.N. (1985) Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 Å. *Science*, **228**, 546-553.
- Burnol, A.F., Margottin, F., Huet, J., Almouzni, G., Prioleau, M.N., Mechali, M. and Sentenac, A. (1993) TFIIC relieves repression of U6 snRNA transcription by chromatin. *Nature*, **362**, 475-477.

Burns, L.G. and Peterson, C.L. (1997) The yeast SWI-SNF complex facilitates binding of a transcriptional activator to nucleosomal sites in vivo. *Mol Cell Biol*, **17**, 4811-4819.

Bushnell, D.A., Cramer, P. and Kornberg, R.D. (2002) Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocystal at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1218-1222.

C

Cairns, B.R. (1998) Chromatin remodeling machines: similar motors, ulterior motives. *Trends Biochem Sci*, **23**, 20-25.

Cairns, B.R. (2001) Emerging roles for chromatin remodeling in cancer biology. *Trends Cell Biol*, **11**, S15-21.

Cairns, B.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Winston, F. and Kornberg, R.D. (1998) Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodeling complexes RSC and SWI/SNF. *Mol Cell*, **2**, 639-651.

Cairns, B.R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B. and Kornberg, R.D. (1996) RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*, **87**, 1249-1260.

Cairns, B.R., Schlichter, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Kornberg, R.D. and Winston, F. (1999) Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains. *Mol Cell*, **4**, 715-723.

Callebaut, I., Courvalin, J.C. and Moron, J.P. (1999) The BAH (bromo-adjacent homology) domain: a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation. *FEBS Lett*, **446**, 189-193.

Cao, Y., Cairns, B.R., Kornberg, R.D. and Laurent, B.C. (1997) Sfh1p, a component of a novel chromatin-remodeling complex, is required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, **17**, 3323-3334.

Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L. and Campos, I. (2000) To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol*, **2**, E107-112.

Carrozza, M.J., John, S., Kumar Sil, A., Hopper, J.E. and Workman, J.L. (2002) Gal80 confers specificity on HAT complex interactions with activators. *J Biol Chem*.

Carruthers, L.M., Bednar, J., Woodcock, C.L. and Hansen, J.C. (1998) Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays: mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding. *Biochemistry*, **37**, 14776-14787.

- Chadee, D.N., Hendzel, M.J., Tylicski, C.P., Allis, C.D., Bazett-Jones, D.P., Wright, J.A. and Davie, J.R. (1999) Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. *J Biol Chem*, **274**, 24914-24920.
- Chai, B., Hsu, J.M., Du, J. and Laurent, B.C. (2002) Yeast RSC Function Is Required for Organization of the Cellular Cytoskeleton via an Alternative PKC1 Pathway. *Genetics*, **161**, 575-584.
- Chedin, S., Ferri, M.L., Peyroche, G., Andrau, J.C., Jourdain, S., Lefebvre, O., Werner, M., Carles, C. and Sentenac, A. (1998a) The yeast RNA polymerase III transcription machinery: a paradigm for eukaryotic gene activation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **63**, 381-389.
- Chedin, S., Riva, M., Schultz, P., Sentenac, A. and Carles, C. (1998b) The RNA cleavage activity of RNA polymerase III is mediated by an essential TFIIIS-like subunit and is important for transcription termination. *Genes Dev*, **12**, 3857-3871.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W. and Stallcup, M.R. (1999) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*, **284**, 2174-2177.
- Chen, N., Bowles, M.R. and Pond, S.M. (1993) Polyclonal amanitin-specific antibodies: production and cytoprotective properties in vitro. *Biochem Pharmacol*, **46**, 327-329.
- Cheong, J.H., Yi, M., Lin, Y. and Murakami, S. (1995) Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation. *Embo J*, **14**, 143-150.
- Cheung, P., Tanner, K.G., Cheung, W.L., Sassone-Corsi, P., Denu, J.M. and Allis, C.D. (2000) Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell*, **5**, 905-915.
- Chiannilkulchai, N., Moenne, A., Sentenac, A. and Mann, C. (1992a) Biochemical and genetic dissection of the *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase C53 subunit through the analysis of a mitochondrially mis-sorted mutant construct. *J Biol Chem*, **267**, 23099-23107.
- Chiannilkulchai, N., Stalder, R., Riva, M., Carles, C., Werner, M. and Sentenac, A. (1992b) RPC82 encodes the highly conserved, third-largest subunit of RNA polymerase C (III) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **12**, 4433-4440.
- Cho, H., Orphanides, G., Sun, X., Yang, X.J., Ogryzko, V., Lees, E., Nakatani, Y. and Reinberg, D. (1998) A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol Cell Biol*, **18**, 5355-5363.

- Christman, M.F., Dietrich, F.S., Levin, N.A., Sadoff, B.U. and Fink, G.R. (1993) The rRNA-encoding DNA array has an altered structure in topoisomerase I mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7637-7641.
- Cmarko, D., Verschure, P.J., Martin, T.E., Dahmus, M.E., Krause, S., Fu, X.D., van Driel, R. and Fakan, S. (1999) Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Mol Biol Cell*, **10**, 211-223.
- Conconi, A., Sogo, J.M. and Ryan, C.A. (1992) Ribosomal gene clusters are uniquely proportioned between open and closed chromatin structures in both tomato leaf cells and exponentially growing suspension cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5256-5260.
- Corden, J.L. and Patturajan, M. (1997) A CTD function linking transcription to splicing. *Trends Biochem Sci*, **22**, 413-416.
- Corthesy, B., Leonnard, P. and Wahli, W. (1990) Transcriptional potentiation of the vitellogenin B1 promoter by a combination of both nucleosome assembly and transcription factors: an in vitro dissection. *Mol Cell Biol*, **10**, 3926-3933.
- Cosma, M. (2002) Ordered recruitment. Gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell*, **10**, 227.
- Cosma, M.P., Tanaka, T. and Nasmyth, K. (1999) Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell*, **97**, 299-311.
- Côté, J., Quinn, J., Workman, J.L. and Peterson, C.L. (1994) Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science*, **265**, 53-60.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnatt, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P.R. and Kornberg, R.D. (2000) Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*, **288**, 640-649.
- Cramer, P., Bushnell, D.A. and Kornberg, R.D. (2001) Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*, **292**, 1863-1876.
- Cremer, T. and Cremer, C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*, **2**, 292-301.
- Croft, J.A., Bridger, J.M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P. and Bickmore, W.A. (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol*, **145**, 1119-1131.
- Csink, A.K. and Henikoff, S. (1998) Large-scale chromosomal movements during interphase progression in *Drosophila*. *J Cell Biol*, **143**, 13-22.

D

- Dadoune, J.P., Siffroi, J.P. and Alfonsi, M.F. (1994) Ultrastructural localization of rDNA and rRNA by in situ hybridization in the nucleolus of human spermatids. *Cell Tissue Res*, **278**, 611-616.
- Damelin, M., Simon, I., Moy, T.I., Wilson, B., Komili, S., Tempst, P., Roth, F.P., Young, R.A., Cairns, B.R. and Silver, P.A. (2002) The Genome-Wide Localization of Rsc9, a Component of the RSC Chromatin-Remodeling Complex, Changes in Response to Stress. *Mol Cell*, **9**, 563-573.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T. and Sogo, J.M. (1993) Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **21**, 2331-2338.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T. and Sogo, J.M. (1995) Transcription in the yeast rRNA gene locus: distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences. *Mol Cell Biol*, **15**, 5294-5303.
- Davie, J.R. and Murphy, L.C. (1990) Level of ubiquitinated histone H2B in chromatin is coupled to ongoing transcription. *Biochemistry*, **29**, 4752-4757.
- Davies, N. and Lindsey, G.G. (1994) Histone H2B (and H2A) ubiquitination allows normal histone octamer and core particle reconstitution. *Biochim Biophys Acta*, **1218**, 187-193.
- De Boni, U. (1994) The interphase nucleus as a dynamic structure. *Int Rev Cytol*, **150**, 149-171.
- De la Barre, A.E., Angelov, D., Molla, A. and Dimitrov, S. (2001) The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *Embo J*, **20**, 6383-6393.
- De Mercoyrol, L., Job, C. and Job, D. (1989) Studies on the inhibition by alpha-amanitin of single-step addition reactions and productive RNA synthesis catalysed by wheat-germ RNA polymerase II. *Biochem J*, **258**, 165-169.
- Dedon, P.C., Soultis, J.A., Allis, C.D. and Gorovsky, M.A. (1991) Formaldehyde cross-linking and immunoprecipitation demonstrate developmental changes in H1 association with transcriptionally active genes. *Mol Cell Biol*, **11**, 1729-1733.
- Deuring, R., Fanti, L., Armstrong, J.A., Sarte, M., Papoulas, O., Prestel, M., Daubresse, G., Verardo, M., Moseley, S.L., Berloco, M., Tsukiyama, T., Wu, C., Pimpinelli, S. and Tamkun, J.W. (2000) The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo. *Mol Cell*, **5**, 355-365.

- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. and Zhou, M.M. (1999a) ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonance assignments for the bromodomain of the histone acetyltransferase P/CAF. *J Biomol NMR*, **14**, 291-292.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. and Zhou, M.M. (1999b) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**, 491-496.
- Dhillon, N. and Kamakaka, R.T. (2000) A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. *Mol Cell*, **6**, 769-780.
- Dieci, G., Hermann-Le Denmat, S., Lukhtanov, E., Thuriaux, P., Werner, M. and Sentenac, A. (1995) A universally conserved region of the largest subunit participates in the active site of RNA polymerase III. *Embo J*, **14**, 3766-3776.
- Dikstein, R., Ruppert, S. and Tjian, R. (1996) TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the base transcription factor RAP74. *Cell*, **84**, 781-790.
- Dilworth, F.J., Fromental-Ramain, C., Remboutsika, E., Benecke, A. and Chambon, P. (1999) Ligand-dependent activation of transcription in vitro by retinoic acid receptor alpha/retinoid X receptor alpha heterodimers that mimics transactivation by retinoids in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1995-2000.
- Dilworth, F.J., Fromental-Ramain, C., Yamamoto, K. and Chambon, P. (2000) ATP-driven chromatin remodeling activity and histone acetyltransferases act sequentially during transactivation by RAR/RXR In vitro. *Mol Cell*, **6**, 1049-1058.
- Dimova, D., Nackerdien, Z., Furgeson, S., Eguchi, S. and Osley, M.A. (1999) A role for transcriptional repressors in targeting the yeast Swi/Snf complex. *Mol Cell*, **4**, 75-83.
- Dorjsuren, D., Lin, Y., Wei, W., Yamashita, T., Nomura, T., Hayashi, N. and Murakami, S. (1998) RMP, a novel RNA polymerase II subunit 5-interacting protein, counteracts transactivation by hepatitis B virus X protein. *Mol Cell Biol*, **18**, 7546-7555.
- Dover, J., Schneider, J., Boateng, M.A., Wood, A., Dean, K., Johnston, M. and Shilatifard, A. (2002) Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by RAD6. *J Biol Chem*.
- Du, J., Nasir, I., Benton, B.K., Kladde, M.P. and Laurent, B.C. (1998) Sth1p, a *Saccharomyces cerevisiae* Snf2p/Swi2p homolog, is an essential ATPase in RSC and differs from Snf/Swi in its interactions with histones and chromatin-associated proteins. *Genetics*, **150**, 987-1005.
- Dundr, M. and Misteli, T. (2001) Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J*, **356**, 297-310.
- Dundr, M. and Raska, I. (1993) Nonisotopic ultrastructural mapping of transcription sites within the nucleolus. *Exp Cell Res*, **208**, 275-281.

E

- Ebbert, R., Birkmann, A. and Schuller, H.J. (1999) The product of the SNF2/SWI2 paralogue INO80 of *Saccharomyces cerevisiae* required for efficient expression of various yeast structural genes is part of a high-molecular-weight protein complex. *Mol Microbiol*, **32**, 741-751.
- Eberharter, A., Ferrari, S., Langst, G., Straub, T., Imhof, A., Varga-Weisz, P., Wilm, M. and Becker, P.B. (2001) Acf1, the largest subunit of CHRAC, regulates ISWI-induced nucleosome remodelling. *Embo J*, **20**, 3781-3788.
- Eberharter, A., John, S., Grant, P.A., Utley, R.T. and Workman, J.L. (1998) Identification and analysis of yeast nucleosomal histone acetyltransferase complexes. *Methods*, **15**, 315-321.
- Eberharter, A., Sterner, D.E., Schieltz, D., Hassan, A., Yates, J.R., 3rd, Berger, S.L. and Workman, J.L. (1999) The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 6621-6631.
- Eisen, M.B. and Brown, P.O. (1999) DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol*, **303**, 179-205.
- Eissenberg, J.C. (2001) Molecular biology of the chromo domain: an ancient chromatin module comes of age. *Gene*, **275**, 19-29.
- Escher, D. and Schaffner, W. (1997) Gene activation at a distance and telomeric silencing are not affected by yeast histone H1. *Mol Gen Genet*, **256**, 456-461.
- Exinger, F. and Lacroute, F. (1992) 6-Azauracil inhibition of GTP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **22**, 9-11.

F

- Faast, R., Thonglairoam, V., Schulz, T.C., Beall, J., Wells, J.R., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, P.D., Tremethick, D.J. and Lyons, I. (2001) Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol*, **11**, 1183-1187.
- Fan, J.Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J.C. and Tremethick, D.J. (2002) The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat Struct Biol*, **9**, 172-176.
- Fan, Y., Sirotkin, A., Russell, R.G., Ayala, J. and Skoultschi, A.I. (2001) Individual somatic H1 subtypes are dispensable for mouse development even in mice lacking the H1(0) replacement subtype. *Mol Cell Biol*, **21**, 7933-7943.

- Fauchon, M., Lagniel, G., Aude, J.C., Lombardia, L., Soularue, P., Petat, C., Marguerie, G., Sentenac, A., Werner, M. and Labarre, J. (2002) Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol Cell*, **9**, 713-723.
- Fazio, T.G., Kooperberg, C., Goldmark, J.P., Neal, C., Basom, R., Delrow, J. and Tsukiyama, T. (2001) Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, **21**, 6450-6460.
- Ferri, M.L., Peyroche, G., Siaut, M., Lefebvre, O., Carles, C., Conesa, C. and Sentenac, A. (2000) A novel subunit of yeast RNA polymerase III interacts with the TFIIB-related domain of TFIIB70. *Mol Cell Biol*, **20**, 488-495.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Flanagan, J.F. and Peterson, C.L. (1999) A role for the yeast SWI/SNF complex in DNA replication. *Nucleic Acids Res*, **27**, 2022-2028.
- Flores, A., Briand, J.F., Gadal, O., Andrau, J.C., Rubbi, L., Van Mullem, V., Boschiero, C., Gousset, M., Marck, C., Carles, C., Thuriaux, P., Sentenac, A. and Werner, M. (1999) A protein-protein interaction map of yeast RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7815-7820.
- Fromont-Racine, M., Rain, J.-C. and Legrain, P. (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nature Genetics*, **16**, 277-282.
- Fryer, C.J. and Archer, T.K. (1998) Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature*, **393**, 88-91.
- Fyodorov, D.V. and Kadonaga, J.T. (2001) The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription. *Cell*, **106**, 523-525.

G

- Gadal, O., Shpakovski, G.V. and Thuriaux, P. (1999) Mutants in ABC10beta, a conserved subunit shared by all three yeast RNA polymerases, specifically affect RNA polymerase I assembly. *J Biol Chem*, **274**, 8421-8427.
- Galitski, T., Saldanha, A.J., Styles, C.A., Lander, E.S. and Fink, G.R. (1999) Ploidy regulation of gene expression. *Science*, **285**, 251-254.
- Gangloff, Y.G., Romier, C., Thuault, S., Werten, S. and Davidson, I. (2001) The histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID. *Trends Biochem Sci*, **26**, 250-257.

- Georgel, P.T., Tsukiyama, T. and Wu, C. (1997) Role of histone tails in nucleosome remodeling by *Drosophila* NURF. *Embo J*, **16**, 4717-4726.
- Glickman, M.H. and Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, **82**, 373-428.
- Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D.A. and Kornberg, R.D. (2001) Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*, **292**, 1876-1882.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 546, 563-547.
- Goldmark, J.P., Fazzio, T.G., Estep, P.W., Church, G.M. and Tsukiyama, T. (2000) The Isw2 chromatin remodeling complex represses early meiotic genes upon recruitment by Ume6p. *Cell*, **103**, 423-433.
- Goodwin, G.H. and Nicolas, R.H. (2001) The BAH domain, polybromo and the RSC chromatin remodelling complex. *Gene*, **268**, 1-7.
- Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., Berger, S.L. and Workman, J.L. (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev*, **11**, 1640-1650.
- Grant, P.A., Eberharter, A., John, S., Cook, R.G., Turner, B.M. and Workman, J.L. (1999) Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem*, **274**, 5895-5900.
- Grant, P.A., Sterner, D.E., Duggan, L.J., Workman, J.L. and Berger, S.L. (1998) The SAGA unfolds: convergence of transcription regulators in chromatin-modifying complexes. *Trends Cell Biol*, **8**, 193-197.
- Gregory, P.D., Schmid, A., Zavari, M., Munsterkotter, M. and Horz, W. (1999) Chromatin remodelling at the PHO8 promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding. *Embo J*, **18**, 6407-6414.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M. and Davenport, K. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 1264-1300.

H

- Haber, J.E. and Leung, W.Y. (1996) Lack of chromosome territoriality in yeast: promiscuous rejoining of broken chromosome ends. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13949-13954.
- Hampsey, M. (1997) A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 1099-1133.
- Han, M. and Grunstein, M. (1988) Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell*, **55**, 1137-1145.
- Han, M., Kim, U.J., Kayne, P. and Grunstein, M. (1988) Depletion of histone H4 and nucleosomes activates the PHO5 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **7**, 2221-2228.
- Hansen, J.C. and Wolffe, A.P. (1992) Influence of chromatin folding on transcription initiation and elongation by RNA polymerase III. *Biochemistry*, **31**, 7977-7988.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816.
- Hassan, A.H., Neely, K.E. and Workman, J.L. (2001) Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell*, **104**, 817-827.
- Hawkes, N.A., Otero, G., Winkler, G.S., Marshall, N., Dahmus, M.E., Krappmann, D., Scheidereit, C., Thomas, C.L., Schiavo, G., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (2002) Purification and characterization of the human elongator complex. *J Biol Chem*, **277**, 3047-3052.
- Hayes, J.J. and Wolffe, A.P. (1992) Histones H2A/H2B inhibit the interaction of transcription factor IIIA with the *Xenopus borealis* somatic 5S RNA gene in a nucleosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 1229-1233.
- Hellauer, K., Sirard, E. and Turcotte, B. (2001) Decreased expression of specific genes in yeast cells lacking histone H1. *J Biol Chem*, **276**, 13587-13592.
- Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P. and Allis, C.D. (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, **106**, 348-360.
- Herrera, J.E., West, K.L., Schiltz, R.L., Nakatani, Y. and Bustin, M. (2000) Histone H1 is a specific repressor of core histone acetylation in chromatin. *Mol Cell Biol*, **20**, 523-529.
- Heun, P., Laroche, T., Shimada, K., Furrer, P. and Gasser, S.M. (2001) Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus. *Science*, **294**, 2181-2186.

- Hill, D.A. and Imbalzano, A.N. (2000) Human SWI/SNF nucleosome remodeling activity is partially inhibited by linker histone H1. *Biochemistry*, **39**, 11649-11656.
- Hirschhorn, J.N., Brown, S.A., Clark, C.D. and Winston, F. (1992) Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev*, **6**, 2288-2298.
- Hoffmann, A., Chiang, C.M., Oelgeschlager, T., Xie, X., Burley, S.K., Nakatani, Y. and Roeder, R.G. (1996) A histone octamer-like structure within TFIID. *Nature*, **380**, 356-359.
- Holstege, F.C., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S. and Young, R.A. (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, **95**, 717-728.
- Howe, L., Ranalli, T.A., Allis, C.D. and Ausio, J. (1998) Transcriptionally active *Xenopus laevis* somatic 5 S ribosomal RNA genes are packaged with hyperacetylated histone H4, whereas transcriptionally silent oocyte genes are not. *J Biol Chem*, **273**, 20693-20696.
- Hozak, P., Cook, P.R., Schofer, C., Mosgoller, W. and Wachtler, F. (1994) Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J Cell Sci*, **107**, 639-648.
- Hsieh, Y.J., Kundu, T.K., Wang, Z., Kovelman, R. and Roeder, R.G. (1999) The TFIIC90 subunit of TFIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol*, **19**, 7697-7704.
- Hsu, J.M. and Laurent, B. (2002) The yeast RSC chromatin-remodeling complex functions at the kinetochore in chromosome transmission. *Gene transcription in yeast*. Euresco conference, Castelvecchio Pascoli (31 may - 5 june 2002).
- Huang, S.Y., Barnard, M.B., Xu, M., Matsui, S., Rose, S.M. and Garrard, W.T. (1986) The active immunoglobulin kappa chain gene is packaged by non-ubiquitin-conjugated nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 3738-3742.
- Hughes, T.R., Mao, M., Jones, A.R., Burchard, J., Marton, M.J., Shannon, K.W., Lefkowitz, S.M., Ziman, M., Schelter, J.M., Meyer, M.R., Kobayashi, S., Davis, C., Dai, H., He, Y.D., Stephanian, S.B., Cavet, G., Walker, W.L., West, A., Coffey, E., Shoemaker, D.D., Stoughton, R., Blanchard, A.P., Friend, S.H. and Linsley, P.S. (2001) Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol*, **19**, 342-347.
- Hughes, T.R., Roberts, C.J., Dai, H., Jones, A.R., Meyer, M.R., Slade, D., Burchard, J., Dow, S., Ward, T.R., Kidd, M.J., Friend, S.H. and Marton, M.J. (2000) Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. *Nat Genet*, **25**, 333-337.

I

- Ikeda, K., Steger, D.J., Eberharter, A. and Workman, J.L. (1999) Activation domain-specific and general transcription stimulation by native histone acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol*, **19**, 855-863.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M. and Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, **403**, 795-800.
- Imbalzano, A.N., Kwon, H., Green, M.R. and Kingston, R.E. (1994) Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature*, **370**, 481-485.
- Ito, T., Levenstein, M.E., Fyodorov, D.V., Kutach, A.K., Kobayashi, R. and Kadonaga, J.T. (1999) ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly. *Genes Dev*, **13**, 1529-1539.
- Izban, M.G. and Luse, D.S. (1991) Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing. *Genes Dev*, **5**, 683-696.

J

- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- John, S., Howe, L., Tafrov, S.T., Grant, P.A., Sternglanz, R. and Workman, J.L. (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**, 1196-1208.

K

- Kadosh, D. and Struhl, K. (1997) Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell*, **89**, 365-371.

- Kaszas, E. and Cande, W.Z. (2000) Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *J Cell Sci*, **113**, 3217-3226.
- Keener, J., Dodd, J.A., Lalo, D. and Nomura, M. (1997) Histones H3 and H4 are components of upstream activation factor required for the high-level transcription of yeast rDNA by RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13458-13462.
- Khochbin, S., Verdel, A., Lemerrier, C. and Seigneurin-Berny, D. (2001) Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 162-166.
- Khoo, B., Brophy, B. and Jackson, S.P. (1994) Conserved functional domains of the RNA polymerase III general transcription factor BRF. *Genes Dev*, **8**, 2879-2890.
- Kikyo, N., Wade, P.A., Guschin, D., Ge, H. and Wolffe, A.P. (2000) Active remodeling of somatic nuclei in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI. *Science*, **289**, 2360-2362.
- Kim, J.H., Lane, W.S. and Reinberg, D. (2002) Human Elongator facilitates RNA polymerase II transcription through chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1241-1246.
- Kim, T.K., Lagrange, T., Wang, Y.H., Griffith, J.D., Reinberg, D. and Ebright, R.H. (1997) Trajectory of DNA in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12268-12273.
- Kim, Y.J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M.H. and Kornberg, R.D. (1994) A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*, **77**, 599-608.
- Kimura, M., Ishiguro, A. and Ishihama, A. (1997) RNA polymerase II subunits 2, 3, and 11 form a core subassembly with DNA binding activity. *J Biol Chem*, **272**, 25851-25855.
- Kingston, R.E. and Narlikar, G.J. (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev*, **13**, 2339-2352.
- Kireeva, M.L., Walter, W., Tchernajenko, V., Bondarenko, V., Kashlev, M. and Studitsky, V.M. (2002) Nucleosome Remodeling Induced by RNA Polymerase II. Loss of the H2A/H2B Dimer during Transcription. *Mol Cell*, **9**, 541-552.
- Klenk, H.P., Renner, O., Schwass, V. and Zillig, W. (1992) Nucleotide sequence of the genes encoding the subunits H, B, A' and A'' of the DNA-dependent RNA polymerase and the initiator tRNA from *Thermoplasma acidophilum*. *Nucleic Acids Res*, **20**, 5226.
- Koleske, A.J. and Young, R.A. (1994) An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature*, **368**, 466-469.

- Kolodziej, P.A., Woychik, N., Liao, S.M. and Young, R.A. (1990) RNA polymerase II subunit composition, stoichiometry, and phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **10**, 1915-1920.
- Kornberg, R.D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, **184**, 868-871.
- Kornberg, R.D. and Thomas, J.O. (1974) Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science*, **184**, 865-868.
- Kouzarides, T. (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 198-209.
- Krebs, J.E., Kuo, M.H., Allis, C.D. and Peterson, C.L. (1999) Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene. *Genes Dev*, **13**, 1412-1421.
- Krogan, N.J., Dover, J., Khorrami, S., Greenblatt, J.F., Schneider, J., Johnston, M. and Shilatifard, A. (2002) COMPASS, a histone H3 (Lysine 4) methyltransferase required for telomeric silencing of gene expression. *J Biol Chem*, **277**, 10753-10755.
- Krogan, N.J. and Greenblatt, J.F. (2001) Characterization of a six-subunit holo-elongator complex required for the regulated expression of a group of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **21**, 8203-8212.
- Kundu, T.K., Wang, Z. and Roeder, R.G. (1999) Human TFIIC relieves chromatin-mediated repression of RNA polymerase III transcription and contains an intrinsic histone acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol*, **19**, 1605-1615.
- Kuo, M.H., vom Baur, E., Struhl, K. and Allis, C.D. (2000) Gcn4 activator targets Gcn5 histone acetyltransferase to specific promoters independently of transcription. *Mol Cell*, **6**, 1309-1320.

L

- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**, 116-120.
- Lalo, D., Carles, C., Sentenac, A. and Thuriaux, P. (1993) Interactions between three common subunits of yeast RNA polymerases I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5524-5528.
- Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S.T., Heller, R.C., Stebbins, J., Pillus, L. and Sternglanz, R. (2000) The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5807-5811.
- Langst, G. and Becker, P.B. (2001) ISWI induces nucleosome sliding on nicked DNA. *Mol Cell*, **8**, 1085-1092.

- Langst, G., Bonte, E.J., Corona, D.F. and Becker, P.B. (1999) Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell*, **97**, 843-852.
- Lanzendörfer, M., Smid, A., Klinger, C., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C. and Riva, M. (1997) A shared subunit belongs to the eukaryotic core RNA polymerase. *Genes Dev*, **11**, 1037-1047.
- Laurent, B.C., Treich, I. and Carlson, M. (1993) The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev*, **7**, 583-591.
- Leach, T.J., Mazzeo, M., Chotkowski, H.L., Madigan, J.P., Wotring, M.G. and Glaser, R.L. (2000) Histone H2A.Z is widely but nonrandomly distributed in chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*, **275**, 23267-23272.
- Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D. and Wolffe, A.P. (1993) A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, **72**, 73-84.
- Lee, T.I., Causton, H.C., Holstege, F.C., Shen, W.C., Hannett, N., Jennings, E.G., Winston, F., Green, M.R. and Young, R.A. (2000) Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature*, **405**, 701-704.
- Léger-Silvestre, I., Trumtel, S., Noaillac-Depeyre, J. and Gas, N. (1999) Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma*, **108**, 103-113.
- Levinger, L. and Varshavsky, A. (1982) Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the *Drosophila* genome. *Cell*, **28**, 375-385.
- Li, W., Nagaraja, S., Delcuve, G.P., Hendzel, M.J. and Davie, J.R. (1993) Effects of histone acetylation, ubiquitination and variants on nucleosome stability. *Biochem J*, **296**, 737-744.
- Lin, Q., Sirotkin, A. and Skoultchi, A.I. (2000) Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t. *Mol Cell Biol*, **20**, 2122-2128.
- Lin, Y., Nomura, T., Cheong, J., Dorjsuren, D., Iida, K. and Murakami, S. (1997) Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5. *J Biol Chem*, **272**, 7132-7139.
- Lo, W.S., Trievel, R.C., Rojas, J.R., Duggan, L., Hsu, J.Y., Allis, C.D., Marmorstein, R. and Berger, S.L. (2000) Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell*, **5**, 917-926.
- Lockhart, D.J. and Winzeler, E.A. (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, **405**, 827-836.

- Logie, C., Tse, C., Hansen, J.C. and Peterson, C.L. (1999) The core histone N-terminal domains are required for multiple rounds of catalytic chromatin remodeling by the SWI/SNF and RSC complexes. *Biochemistry*, **38**, 2514-2522.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., III, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachet, A., Philipsen, P. and Pringle, J.R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 953-961.
- Lorch, Y., Beve, J., Gustafsson, C.M., Myers, L.C. and Kornberg, R.D. (2000) Mediator-nucleosome interaction. *Mol Cell*, **6**, 197-201.
- Lorch, Y., Cairns, B.R., Zhang, M. and Kornberg, R.D. (1998) Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome. *Cell*, **94**, 29-34.
- Lorch, Y., LaPointe, J.W. and Kornberg, R.D. (1992) Initiation on chromatin templates in a yeast RNA polymerase II transcription system. *Genes Dev*, **6**, 2282-2287.
- Lorch, Y., Zhang, M. and Kornberg, R.D. (1999) Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell*, **96**, 389-392.
- Lorch, Y., Zhang, M. and Kornberg, R.D. (2001) RSC unravels the nucleosome. *Mol Cell*, **7**, 89-95.
- Lucchini, R. and Sogo, J.M. (1992) Different chromatin structures along the spacers flanking active and inactive *Xenopus* rRNA genes. *Mol Cell Biol*, **12**, 4288-4296.
- Lucchini, R. and Sogo, J.M. (1995) Replication of transcriptionally active chromatin. *Nature*, **374**, 276-280.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
- Luo, R.X., Postigo, A.A. and Dean, D.C. (1998) Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell*, **92**, 463-473.

M

- Ma, H., Baumann, C.T., Li, H., Strahl, B.D., Rice, R., Jelinek, M.A., Aswad, D.W., Allis, C.D., Hager, G.L. and Stallcup, M.R. (2001) Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter. *Curr Biol*, **11**, 1981-1985.
- Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J.P., Troalen, F., Trouche, D. and Harel-Bellan, A. (1998) Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature*, **391**, 601-605.

- Mahadevan, L.C., Willis, A.C. and Barratt, M.J. (1991) Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell*, **65**, 775-783.
- Mann, C., Buhler, J.M., Treich, I. and Sentenac, A. (1987) RPC40, a unique gene for a subunit shared between yeast RNA polymerases A and C. *Cell*, **48**, 627-637.
- Marcus, G.A., Silverman, N., Berger, S.L., Horiuchi, J. and Guarente, L. (1994) Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *Embo J*, **13**, 4807-4815.
- Marks, P., Rifkind, R.A., Richon, V.M., Breslow, R., Miller, T. and Kelly, W.K. (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature Rev Cancer*, **1**, 194-202.
- Marsolier, M.C., Tanaka, S., Livingstone-Zatchej, M., Grunstein, M., Thoma, F. and Sentenac, A. (1995) Reciprocal interferences between nucleosomal organization and transcriptional activity of the yeast SNR6 gene. *Genes Dev*, **9**, 410-422.
- McMahon, S.B., Van Buskirk, H.A., Dugan, K.A., Copeland, T.D. and Cole, M.D. (1998) The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell*, **94**, 363-374.
- Mimnaugh, E.G., Chen, H.Y., Davie, J.R., Celis, J.E. and Neckers, L. (1997) Rapid deubiquitination of nucleosomal histones in human tumor cells caused by proteasome inhibitors and stress response inducers: effects on replication, transcription, translation, and the cellular stress response. *Biochemistry*, **36**, 14418-14429.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E.A., Darst, S.A., Ebright, R.H. and Severinov, K. (2001) Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 892-897.
- Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M. and Brown, D.T. (2000) Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, **408**, 877-881.
- Miyao, T. and Woychik, N.A. (1998) RNA polymerase subunit RPB5 plays a role in transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15281-15286.
- Moreira, J.M. and Holmberg, S. (1999) Transcriptional repression of the yeast CHA1 gene requires the chromatin-remodeling complex RSC. *Embo J*, **18**, 2836-2844.
- Muchardt, C. and Yaniv, M. (1999a) ATP-dependent chromatin remodelling: SWI/SNF and Co. are on the job. *J Mol Biol*, **293**, 187-198.
- Muchardt, C. and Yaniv, M. (1999b) The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 189-195.

Muchardt, C. and Yaniv, M. (2001) When the SWI/SNF complex remodels...the cell cycle. *Oncogene*, **20**, 3067-3075.

N

Nagele, R., Freeman, T., McMorro, L. and Lee, H.Y. (1995) Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosomal order. *Science*, **270**, 1831-1835.

Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D. and Grewal, S.I. (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, **292**, 110-113.

Narlikar, G.J., Fan, H.Y. and Kingston, R.E. (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, **108**, 475-487.

Narlikar, G.J., Phelan, M.L. and Kingston, R.E. (2001) Generation and interconversion of multiple distinct nucleosomal states as a mechanism for catalyzing chromatin fluidity. *Mol Cell*, **8**, 1219-1230.

Neish, A.S., Anderson, S.F., Schlegel, B.P., Wei, W. and Parvin, J.D. (1998) Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Res*, **26**, 847-853.

Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A. and Struhl, K. (2002) Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev*, **16**, 806-819.

Nickel, B.E., Allis, C.D. and Davie, J.R. (1989) Ubiquitinated histone H2B is preferentially located in transcriptionally active chromatin. *Biochemistry*, **28**, 958-963.

Nicolas, R.H. and Goodwin, G.H. (1996) Molecular cloning of polybromo, a nuclear protein containing multiple domains including five bromodomains, a truncated HMG-box, and two repeats of a novel domain. *Gene*, **175**, 233-240.

Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E. and Kouzarides, T. (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, **412**, 561-565.

Nierras, C.R., Liebman, S.W. and Warner, J.R. (1997) Does *Saccharomyces* need an organized nucleolus? *Chromosoma*, **105**, 444-451.

Nogi, Y., Vu, L. and Nomura, M. (1991) An Approach for isolation of mutants defective in 35S ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7026-7030.

- Nogi, Y., Yano, R., Dodd, J., Carles, C. and Nomura, M. (1993) Gene RRN4 in *Saccharomyces cerevisiae* encodes the A12.2 subunit of RNA polymerase I and is essential only at high temperatures. *Mol Cell Biol*, **13**, 114-122.
- Nonet, M.L. and Young, R.A. (1989) Intragenic and extragenic suppressors of mutations in the heptapeptide repeat domain of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II. *Genetics*, **123**, 715-724.
- Nouraini, S., Archambault, J. and Friesen, J.D. (1996) Rpo26p, a subunit common to yeast RNA polymerases, is essential for the assembly of RNA polymerases I and II and for the stability of the largest subunits of these enzymes. *Mol Cell Biol*, **16**, 5985-5996.
- Nouraini, S., Xu, D., Nelson, S., Lee, M. and Friesen, J.D. (1997) Genetic evidence for selective degradation of RNA polymerase subunits by the 20S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3570-3579.

O

- O'Neill, T.E., Meersseman, G., Pennings, S. and Bradbury, E.M. (1995) Deposition of histone H1 onto reconstituted nucleosome arrays inhibits both initiation and elongation of transcripts by T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, **23**, 1075-1082.
- Oakes, M., Aris, J.P., Brockenbrough, J.S., Wai, H., Vu, L. and Nomura, M. (1998) Mutational analysis of the structure and localization of the nucleolus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **143**, 23-34.
- Oelgeschlager, T. (2002) Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control. *J Cell Physiol*, **190**, 160-169.
- Ogryzko, V.V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R.L., Howard, T., Yang, X.J., Howard, B.H., Qin, J. and Nakatani, Y. (1998) Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell*, **94**, 35-44.
- Olson, M.O., Dundr, M. and Szebeni, A. (2000) The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol*, **10**, 189-196.
- Ornaghi, P., Ballario, P., Lena, A.M., Gonzalez, A. and Filetici, P. (1999) The bromodomain of Gcn5p interacts in vitro with specific residues in the N terminus of histone H4. *J Mol Biol*, **287**, 1-7.
- Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C.H., Luse, D.S. and Reinberg, D. (1998) FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell*, **92**, 105-116.
- Otero, G., Fellows, J., Li, Y., de Bizemont, T., Dirac, A.M., Gustafsson, C.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (1999) Elongator, a

multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell*, **3**, 109-118.

P

- Parag, H.A., Raboy, B. and Kulka, R.G. (1987) Effect of heat shock on protein degradation in mammalian cells: involvement of the ubiquitin system. *Embo J*, **6**, 55-61.
- Parvin, J.D. and Young, R.A. (1998) Regulatory targets in the RNA polymerase II holoenzyme. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 565-570.
- Patterton, H.G., Landel, C.C., Landsman, D., Peterson, C.L. and Simpson, R.T. (1998) The biochemical and phenotypic characterization of Hho1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 7268-7276.
- Perlmann, T. and Wrange, O. (1988) Specific glucocorticoid receptor binding to DNA reconstituted in a nucleosome. *Embo J*, **7**, 3073-3079.
- Peterson, C.L., Zhao, Y. and Chait, B.T. (1998) Subunits of the yeast SWI/SNF complex are members of the actin-related protein (ARP) family. *J Biol Chem*, **273**, 23641-23644.
- Pham, A.D. and Sauer, F. (2000) Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science*, **289**, 2357-2360.
- Phelan, M.L., Schnitzler, G.R. and Kingston, R.E. (2000) Octamer transfer and creation of stably remodeled nucleosomes by human SWI-SNF and its isolated ATPases. *Mol Cell Biol*, **20**, 6380-6389.
- Phelan, M.L., Sif, S., Narlikar, G.J. and Kingston, R.E. (1999) Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell*, **3**, 247-253.
- Philippson, P., Thomas, M., Cramer, R.A. and Davis, R.W. (1978) Unique arrangement of coding sequences for 5S, 5.8S, 18 S and 25 S ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae* as determined by R loop and hybridization analysis. *J. Mol. Biol.*, **123**, 387-404.
- Pogo, B.G., Allfrey, V.G. and Mirsky, A.E. (1967) The effect of phytohemagglutinin on ribonucleic acid synthesis and histone acetylation in equine leukocytes. *J Cell Biol*, **35**, 477-482.
- Pokholok, D.K., Hannett, N.M. and Young, R.A. (2002) Exchange of RNA Polymerase II Initiation and Elongation Factors during Gene Expression In Vivo. *Mol Cell*, **9**, 799-809.

- Poot, R.A., Dellaire, G., Hulsmann, B.B., Grimaldi, M.A., Corona, D.F., Becker, P.B., Bickmore, W.A. and Varga-Weisz, P.D. (2000) HuCHRAC, a human ISWI chromatin remodelling complex contains hACF1 and two novel histone-fold proteins. *Embo J*, **19**, 3377-3387.
- Proudfoot, N.J., Furger, A. and Dye, M.J. (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, **108**, 501-512.
- Puvion-Dutilleul, F., Puvion, E. and Bachellerie, J.P. (1997) Early stages of pre-rRNA formation within the nucleolar ultrastructure of mouse cells studied by in situ hybridization with a 5'ETS leader probe. *Chromosoma*, **105**, 496-505.

R

- Rabini, S., Franke, K., Saftig, P., Bode, C., Doenecke, D. and Drabent, B. (2000) Spermatogenesis in mice is not affected by histone H1.1 deficiency. *Exp Cell Res*, **255**, 114-124.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. and Jenuwein, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593-599.
- Redner, R.L., Wang, J. and Liu, J.M. (1999) Chromatin remodeling and leukemia: new therapeutic paradigms. *Blood*, **94**, 417-428.
- Reeves, R. (1984) Transcriptionally active chromatin. *Biochim Biophys Acta*, **782**, 343-393.
- Reeves, R. and Nissen, M.S. (1990) The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem*, **265**, 8573-8582.
- Reifsnyder, C., Lowell, J., Clarke, A. and Pillus, L. (1996) Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases. *Nat Genet*, **14**, 42-49.
- Reinke, H., Gregory, P.D. and Horz, W. (2001) A transient histone hyperacetylation signal marks nucleosomes for remodeling at the PHO8 promoter in vivo. *Mol Cell*, **7**, 529-538.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, J.J., Aparicio, O., Jennings, E.G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., Volkert, T.L., Wilson, C.J., Bell, S.P. and Young, R.A. (2000) Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*, **290**, 2306-2309.

- Roberts, C.W., Galusha, S.A., McMenamin, M.E., Fletcher, C.D. and Orkin, S.H. (2000) Haploinsufficiency of Snf5 (integrase interactor 1) predisposes to malignant rhabdoid tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13796-13800.
- Roberts, S.M. and Winston, F. (1997) Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes. *Genetics*, **147**, 451-465.
- Roby, D., Suka, Y., Xenarios, I., kurdistani, S.K., Wang, A., Suka, N. and Grunstein, M. (2002) Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell*, **109**, 437-446.
- Robzyk, K., Recht, J. and Osley, M.A. (2000) Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science*, **287**, 501-504.
- Roth, S.Y., Denu, J.M. and Allis, C.D. (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*, **70**, 81-120.
- Rozenfeld, S. and Thuriaux, P. (2001) A genetic look at the active site of RNA polymerase III. *EMBO Rep*, **2**, 598-603.
- Rubbi, L., Labarre-Mariotte, S., Chedin, S. and Thuriaux, P. (1999) Functional characterization of ABC10alpha, an essential polypeptide shared by all three forms of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *J Biol Chem*, **274**, 31485-31492.
- Rubin, G.M. (1975) Preparation of RNA and ribosomes from yeast. *Methods Cell Biol*, **12**, 45-64.
- Rundlett, S.E., Carmen, A.A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B.M. and Grunstein, M. (1996) HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14503-14508.

S

- Saez-Vasquez, J. and Pikaard, C.S. (1997) Extensive purification of a putative RNA polymerase I holoenzyme from plants that accurately initiates rRNA gene transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11869-11874.
- Salin, H., Vujasinovic, T., Mazurie, A., Maitrejean, S., Menini, C., Mallet, J. and Dumas, S. (2002) A novel sensitive microarray approach for differential screening using probes labelled with two different radioelements. *Nucleic Acids Res*, **30**, e17.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. In. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Sanders, S.L., Jennings, J., Canutescu, A., Link, A.J. and Weil, P.A. (2002) Proteomics of the eukaryotic transcription machinery: identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry. *Mol Cell Biol*, **22**, 4723-4738.
- Santisteban, M.S., Kalashnikova, T. and Smith, M.M. (2000) Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell*, **103**, 411-422.
- Sassone-Corsi, P., Mizzen, C.A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., Jacquot, S., Hanauer, A. and Allis, C.D. (1999) Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science*, **285**, 886-891.
- Schena, M. (2000) *Microarray biochip technology*. Eaton publishing BioTechniques Books Division, Natick.
- Schild, C., Claret, F.X., Wahli, W. and Wolffe, A.P. (1993) A nucleosome-dependent static loop potentiates estrogen-regulated transcription from the *Xenopus* vitellogenin B1 promoter in vitro. *Embo J*, **12**, 423-433.
- Schnitzler, G., Sif, S. and Kingston, R.E. (1998) Human SWI/SNF interconverts a nucleosome between its base state and a stable remodeled state. *Cell*, **94**, 17-27.
- Schultz, P., Celia, H., Riva, M., Sentenac, A. and Oudet, P. (1993) Three-dimensional model of yeast RNA polymerase I determined by electron microscopy of two-dimensional crystals. *Embo J*, **12**, 2601-2607.
- Seither, P., Iben, S. and Grummt, I. (1998) Mammalian RNA polymerase I exists as a holoenzyme with associated basal transcription factors. *J. Mol. Biol*, **275**, 43-53.
- Sentenac, A., Riva, M., Thuriaux, P., Buhler, J.-M., Treich, I., Carles, C., Werner, M., Ruet, A., Huet, J., Mann, C., Chiannikulchai, N., Stettler, S. and Mariotte, S. (1992) Yeast RNA polymerase subunits and genes. In Yamamoto, K.R. and McKnight, S.L. (eds.), *Transcriptional regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Vol. 1, pp. 27-53.
- Severinov, K., Markov, D., Severinova, E., Nikiforov, V., Landick, R., Darst, S.A. and Goldfarb, A. (1995) Streptolydigin-resistant mutants in an evolutionarily conserved region of the beta' subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Biol Chem*, **270**, 23926-23929.
- Shen, X. and Gorovsky, M.A. (1996) Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription in vivo. *Cell*, **86**, 475-483.
- Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A. and Wu, C. (2000) A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature*, **406**, 541-544.
- Shoemaker, D.D., Schadt, E.E., Armour, C.D., He, Y.D., Garrett-Engle, P., McDonagh, P.D., Loerch, P.M., Leonardson, A., Lum, P.Y., Cavet, G., Wu, L.F., Altschuler, S.J., Edwards, S., King, J., Tsang, J.S., Schimmack, G., Schelter, J.M., Koch, J., Ziman, M., Marton, M.J., Li, B., Cundiff, P., Ward, T., Castle, J.,

- Krolewski, M., Meyer, M.R., Mao, M., Burchard, J., Kidd, M.J., Dai, H., Phillips, J.W., Linsley, P.S., Stoughton, R., Scherer, S. and Boguski, M.S. (2001) Experimental annotation of the human genome using microarray technology. *Nature*, **409**, 922-927.
- Shpakovski, G.V., Acker, J., Wintzerith, M., Lacroix, J.F., Thuriaux, P. and Vigneron, M. (1995) Four subunits that are shared by the three classes of RNA polymerase are functionally interchangeable between *Homo sapiens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *MCB*, **15**, 4702-4710.
- Shpakovski, G.V., Gadai, O., Labarre-Mariotte, S., Lebedenko, E.N., Miklos, I., Sakurai, H., Proshkin, S.A., Van Mullem, V., Ishihama, A. and Thuriaux, P. (2000) Functional conservation of RNA polymerase II in fission and budding yeasts. *J Mol Biol*, **295**, 1119-1127.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Silverman, N., Agapite, J. and Guarente, L. (1994) Yeast ADA2 protein binds to the VP16 protein activation domain and activates transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11665-11668.
- Sirotkin, A.M., Edelman, W., Cheng, G., Klein-Szanto, A., Kucherlapati, R. and Skoultschi, A.I. (1995) Mice develop normally without the H1(0) linker histone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6434-6438.
- Smith, J.S. and Boeke, J.D. (1997) An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev*, **11**, 241-254.
- Smith, J.S., Brachmann, C.B., Celic, I., Kenna, M.A., Muhammad, S., Starai, V.J., Avalos, J.L., Escalante-Semerena, J.C., Grubmeyer, C., Wolberger, C. and Boeke, J.D. (2000) A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6658-6663.
- Solow, S., Salunek, M., Ryan, R. and Lieberman, P.M. (2001) Taf(II) 250 phosphorylates human transcription factor IIA on serine residues important for TBP binding and transcription activity. *J Biol Chem*, **276**, 15886-15892.
- Southern, E.M. (2001) DNA microarrays. History and overview. *Methods Mol Biol*, **170**, 1-15.
- Soutoglou, E. and Talianidis, I. (2002) Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science*, **295**, 1901-1904.
- Spencer, V.A. and Davie, J.R. (1999) Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene*, **240**, 1-12.

- Srinivasan, L. and Gopinathan, K.P. (2002) Characterization of RNA polymerase III transcription factor TFIIIC from the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. *Eur J Biochem*, **269**, 1780-1789.
- Steinmetz, E.J. (1997) Pre-mRNA processing and the CTD of RNA polymerase II: the tail that wags the dog? *Cell*, **89**, 491-494.
- Sterner, D.E. and Berger, S.L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 435-459.
- Sterner, D.E., Grant, P.A., Roberts, S.M., Duggan, L.J., Belotserkovskaya, R., Pacella, L.A., Winston, F., Workman, J.L. and Berger, S.L. (1999) Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Mol Cell Biol*, **19**, 86-98.
- Stettler, S., Chiannikulchai, N., Hermann-Le Denmat, S., Lalo, D., Lacroute, F., Sentenac, A. and Thuriaux, P. (1993) A general suppressor of RNA polymerase I, II and III mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, **239**, 169-176.
- Stettler, S., Mariotte, S., Riva, M., Sentenac, A. and Thuriaux, P. (1992) An essential and specific subunit of RNA polymerase III (C) is encoded by gene RPC34 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **267**, 21390-21395.
- Stokes, D.G., Tartof, K.D. and Perry, R.P. (1996) CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7137-7142.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
- Strahl, B.D., Grant, P.A., Briggs, S.D., Sun, Z.W., Bone, J.R., Caldwell, J.A., Mollah, S., Cook, R.G., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Allis, C.D. (2002) Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, **22**, 1298-1306.
- Strahl, B.D., Ohba, R., Cook, R.G. and Allis, C.D. (1999) Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14967-14972.
- Strohner, R., Nemeth, A., Jansa, P., Hofmann-Rohrer, U., Santoro, R., Langst, G. and Grummt, I. (2001) NoRC--a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *Embo J*, **20**, 4892-4900.
- Studitsky, V.M., Kassavetis, G.A., Geiduschek, E.P. and Felsenfeld, G. (1997) Mechanism of transcription through the nucleosome by eukaryotic RNA polymerase. *Science*, **278**, 1960-1963.
- Sudarsanam, P., Cao, Y., Wu, L., Laurent, B.C. and Winston, F. (1999) The nucleosome remodeling complex, Snf/Swi, is required for the maintenance of

- transcription in vivo and is partially redundant with the histone acetyltransferase, Gcn5. *Embo J*, **18**, 3101-3106.
- Sudarsanam, P., Iyer, V.R., Brown, P.O. and Winston, F. (2000) Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3364-3369.
- Sun, H.B., Shen, J. and Yokota, H. (2000) Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys J*, **79**, 184-190.
- Sun, Z.W. and Allis, C.D. (2002) Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, **418**, 104-108.
- Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J. and Luger, K. (2000) Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol*, **7**, 1121-1124.
- Swerdlow, P.S., Schuster, T. and Finley, D. (1990) A conserved sequence in histone H2A which is a ubiquitination site in higher eucaryotes is not required for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **10**, 4905-4911.
- Syntichaki, P., Topalidou, I. and Thireos, G. (2000) The Gcn5 bromodomain coordinates nucleosome remodelling. *Nature*, **404**, 414-417.

T

- Taunton, J., Hassig, C.A. and Schreiber, S.L. (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, **272**, 408-411.
- Thuillier, V., Brun, I., Sentenac, A. and Werner, M. (1996) Mutations in the alpha-amanitin conserved domain of the largest subunit of yeast RNA polymerase III affect pausing, RNA cleavage and transcriptional transitions. *Embo J*, **15**, 618-629.
- Thuillier, V., Stettler, S., Sentenac, A., Thuriaux, P. and Werner, M. (1995) A mutation in the C31 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III affects transcription initiation. *Embo J*, **14**, 351-359.
- Todone, F., Weinzierl, R.O., Brick, P. and Onesti, S. (2000) Crystal structure of RPB5, a universal eukaryotic RNA polymerase subunit and transcription factor interaction target. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6306-6310.
- Tong, J.K., Hassig, C.A., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E. and Schreiber, S.L. (1998) Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature*, **395**, 917-921.
- Torchet, C., Jacq, C. and Hermann-Le Denmat, S. (1998) Two mutant forms of the S1/TPR-containing protein Rrp5p affect the 18S rRNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna*, **4**, 1636-1652.

- Tran, H.G., Steger, D.J., Iyer, V.R. and Johnson, A.D. (2000) The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *Embo J*, **19**, 2323-2331.
- Travers, A. (1999) The location of the linker histone on the nucleosome. *Trends Biochem Sci*, **24**, 4-7.
- Treich, I. and Carlson, M. (1997) Interaction of a Swi3 homolog with Sth1 provides evidence for a Swi/Snf-related complex with an essential function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **17**, 1768-1775.
- Tremethick, D., Zucker, K. and Worcel, A. (1990) The transcription complex of the 5 S RNA gene, but not transcription factor IIIA alone, prevents nucleosomal repression of transcription. *J Biol Chem*, **265**, 5014-5023.
- Tse, C., Takashi, S., Wolffe, A.P. and Hansen, J.C. (1998) Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *MCB*, **18 n°8**, 4629-4638.
- Tsuchiya, E., Hosotani, T. and Miyakawa, T. (1998) A mutation in NPS1/STH1, an essential gene encoding a component of a novel chromatin-remodeling complex RSC, alters the chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae* centromeres. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3286-3292.
- Tsukiyama, T. and Wu, C. (1997) Chromatin remodeling and transcription. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 182-191.

U

- Urnov, F.D. and Wolffe, A.P. (2001) Chromatin remodeling and transcriptional activation: the cast (in order of appearance). *Oncogene*, **20**, 2991-3006.
- Ushinsky, S.C., Bussey, H., Ahmed, A.A., Wang, Y., Friesen, J., Williams, B.A. and Storms, R.K. (1997) Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 151-161.
- Utle, R.T., Ikeda, K., Grant, P.A., Côté, J., Steger, D.J., Eberharter, A., John, S. and Workman, J.L. (1998) Transcriptional acitvators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature*, **394**, 498-502.

V

- Van Hooser, A., Goodrich, D.W., Allis, C.D., Brinkley, B.R. and Mancini, M.A. (1998) Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not

- maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci*, **111**, 3497-3506.
- Van Mullem, V., Wery, M., Werner, M., Vandenhaute, J. and Thuriaux, P. (2002) The Rpb9 subunit of RNA polymerase II binds transcription factor TFIIE and interferes with the SAGA and elongator histone acetyltransferases. *J Biol Chem*, **277**, 10220-10225.
- Varga-Weisz, P.D., Wilm, M., Bonte, E., Dumas, K., Mann, M. and Becker, P.B. (1997) Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature*, **388**, 598-602.
- Vassilyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M.N., Borukhov, S. and Yokoyama, S. (2002) Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*, **417**, 712-719.
- Versteeg, I., Sevenet, N., Lange, J., Rousseau-Merck, M.F., Ambros, P., Handgretinger, R., Aurias, A. and Delattre, O. (1998) Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature*, **394**, 203-206.
- Vidal, M. and Gaber, R.F. (1991) RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **11**, 6317-6327.
- Vogelauer, M., Wu, J., Suka, N. and Grunstein, M. (2000) Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature*, **408**, 495-498.
- Voutsina, A., Riva, M., Carles, C. and Alexandraki, D. (1999) Sequence divergence of the RNA polymerase shared subunit ABC14.5 (Rpb8) selectively affects RNA polymerase III assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **27**, 1047-1055.

W

- Wade, P.A., Geggion, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F. and Wolffe, A.P. (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet*, **23**, 62-66.
- Wade, P.A., Jones, P.L., Vermaak, D. and Wolffe, A.P. (1998) A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from *Xenopus laevis* cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase. *Curr Biol*, **8**, 843-846.
- Wai, H.H., Vu, L., Oakes, M. and Nomura, M. (2000) Complete deletion of yeast chromosomal rDNA repeats and integration of a new rDNA repeat: use of rDNA deletion strains for functional analysis of rDNA promoter elements in vivo. *Nucleic Acids Res*, **28**, 3524-3534.

- Wang, H.B. and Zhang, Y. (2001) Mi2, an auto-antigen for dermatomyositis, is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2517-2521.
- Wang, W., Cote, J., Xue, Y., Zhou, S., Khavari, P.A., Biggar, S.R., Muchardt, C., Kalpana, G.V., Goff, S.P., Yaniv, M., Workman, J.L. and Crabtree, G.R. (1996a) Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *Embo J*, **15**, 5370-5382.
- Wang, W., Xue, Y., Zhou, S., Kuo, A., Cairns, B.R. and Crabtree, G.R. (1996b) Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev*, **10**, 2117-2130.
- Wang, Z., Luo, T. and Roeder, R.G. (1997) Identification of an autonomously initiating RNA polymerase III holoenzyme containing a novel factor that is selectively inactivated during protein synthesis inhibition. *Genes Dev*, **11**, 2371-2382.
- Wang, Z. and Roeder, R.G. (1997) Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. *Genes Dev*, **11**, 1315-1326.
- Wassarman, D.A. and Sauer, F. (2001) TAF(II)250: a transcription toolbox. *J Cell Sci*, **114**, 2895-2902.
- Wei, W., Dorjsuren, D., Lin, Y., Qin, W., Nomura, T., Hayashi, N. and Murakami, S. (2001) Direct interaction between the subunit RAP30 of transcription factor IIF (TFIIF) and RNA polymerase subunit 5, which contributes to the association between TFIIF and RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **276**, 12266-12273.
- Wei, Y., Mizzen, C.A., Cook, R.G., Gorovsky, M.A. and Allis, C.D. (1998) Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7480-7484.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A. and Allis, C.D. (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, **97**, 99-109.
- Werner, M., Chaussivert, N., Willis, I.M. and Sentenac, A. (1993) Interaction between a complex of RNA polymerase III subunits and the 70-kDa component of transcription factor IIIB. *J Biol Chem*, **268**, 20721-20724.
- Werner, M., Hermann-Le Denmat, S., Treich, I., Sentenac, A. and Thuriaux, P. (1992) Effect of mutations in a zinc-binding domain of yeast RNA polymerase C (III) on enzyme function and subunit association. *Mol Cell Biol*, **12**, 1087-1095.
- White, C.L., Suto, R.K. and Luger, K. (2001) Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *Embo J*, **20**, 5207-5218.

- White, R.J. (1998) *RNA polymerase III transcription*. Springer-Verlag, Heildelberg.
- Whitehouse, I., Flaus, A., Cairns, B.R., White, M.F., Workman, J.L. and Owen-Hughes, T. (1999) Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature*, **400**, 784-787.
- Widom, J. (1997) Getting around the nucleosomes [comment]. *Science*, **278**, 1899-1901.
- Wilson, C.J., Chao, D.M., Imbalzano, A.N., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E. and Young, R.A. (1996) RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell*, **84**, 235-244.
- Winkler, G.S., Kristjuhan, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (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**, 3517-3522.
- Winkler, G.S., Petrakis, T.G., Ethelberg, S., Tokunaga, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (2001) RNA polymerase II elongator holoenzyme is composed of two discrete subcomplexes. *J Biol Chem*, **276**, 32743-32749.
- Winston, F. and Carlson, M. (1992) Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet*, **8**, 387-391.
- Wittschieben, B.O., Otero, G., de Bizemont, T., Fellows, J., Erdjument-Bromage, H., Ohba, R., Li, Y., Allis, C.D., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (1999) A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell*, **4**, 123-128.
- Wolffe, A.P. (1998) *Chromatin, structure and function*. Academic Press, San Ddiego.
- Wolffe, A.P. (2001) Chromatin remodeling: why it is important in cancer. *Oncogene*, **20**, 2988-2990.
- Workman, J.L. and Kingston, R.E. (1992) Nucleosome core displacement in vitro via a metastable transcription factor-nucleosome complex. *Science*, **258**, 1780-1784.
- Wu, L. and Winston, F. (1997) Evidence that Snf-Swi controls chromatin structure over both the TATA and UAS regions of the SUC2 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4230-4234.

X

- Xue, Y., Canman, J.C., Lee, C.S., Nie, Z., Yang, D., Moreno, G.T., Young, M.K., Salmon, E.D. and Wang, W. (2000) The human SWI/SNF-B chromatin-remodeling complex is related to yeast rsc and localizes at kinetochores of mitotic chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13015-13020.

Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Cote, J. and Wang, W. (1998) NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell*, **2**, 851-861.

Y

Yee, A., Booth, V., Dharamsi, A., Engel, A., Edwards, A.M. and Arrowsmith, C.H. (2000) Solution structure of the RNA polymerase subunit RPB5 from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6311-6315.

Z

Zaychikov, E., Martin, E., Denissova, L., Kozlov, M., Markovtsov, V., Kashlev, M., Heumann, H., Nikiforov, V., Goldfarb, A. and Mustaev, A. (1996) Mapping of catalytic residues in the RNA polymerase active center. *Science*, **273**, 107-109.

Zhang, H.S. and Dean, D.C. (2001) Rb-mediated chromatin structure regulation and transcriptional repression. *Oncogene*, **20**, 3134-3138.

Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H.P., Lane, W.S. and Reinberg, D. (1998) The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell*, **95**, 279-289.

Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A. and Reinberg, D. (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*, **13**, 1924-1935.

L'ADN est condensé dans le noyau sous forme de chromatine. La structure chromatinienne de l'ADN est un obstacle pour la transcription car elle limite l'accessibilité de l'ADN. Des complexes spécialisés sont capables de remodeler cette structure. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les complexes RSC (Remodels the Structure of Chromatin) et SWI/SNF sont apparentés comme en témoignent les homologies existant entre plusieurs de leurs sous-unités. Toutefois, seul le complexe RSC, plus abondant que SWI/SNF, est essentiel à la viabilité cellulaire. Ceci suggère qu'il pourrait avoir de multiples rôles dont un dans la transcription.

La transcription est réalisée chez les eucaryotes par trois ARN polymérases (pol) différentes chacune spécifique d'une classe de gènes. Nous avons montré que le complexe RSC interagit avec les ARN polymérases I et III. Notre attention s'est portée sur l'interaction entre la sous-unité Rsc4 et la protéine ABC27, commune aux trois ARN polymérases. La protéine Rsc4 interagit en double-hybride avec ABC27 par son domaine C-terminal. Nous avons étudié un mutant de la sous-unité Rsc4 ayant perdu la capacité d'interagir avec ABC27. Les profils d'expression génomiques, établis par puces à ADN, ont permis de caractériser des effets de cette mutation sur la transcription par l'ARN polymérase II. Curieusement, la majorité des gènes induits sont répartis par le chromosome XII. Cet effet n'est pas polaire. La présence de l'ADN ribosomique sur ce chromosome nous a conduits à proposer qu'il pourrait être une cause de ce comportement particulier. Nous avons mis en évidence des modifications dans la voie de maturation de l'ARN 35S, transcrit par la pol I, mais nous n'avons pas pu caractériser des défauts de transcription par les ARN polymérases I et III.

Mots Clés :

ARN polymérases, chromatine, transcription, transcriptome, puces à ADN, remodelage de la chromatine, RSC, *Saccharomyces cerevisiae*.

Adresse du laboratoire :

Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Bâtiment 144
Laboratoire de Physiogénomique
Commissariat à l'Énergie Atomique/Saclay
91 191 Gif-sur-Yvette cedex

DNA is condensed into chromatin in the eukaryotic nucleus thanks to a wrapping around nucleosomes. This nucleosomal structure hampers transcription by restricting RNA polymerases access to DNA. Specialised complexes are responsible for chromatin remodelling. Those entities are essential for transcription. In yeast, remodeling complexes include the Remodels Structure of Chromatin (RSC) and the SWI/SNF complexes. Although these complexes are closely related, as judged by the identity or homology between some of their respective subunits, only the more abundant RSC complex is essential for cell viability. This fact suggests that this complex might play an important role in transcription and/or assume other essential functions within the cell.

Eukaryotic transcription is carried out by three RNA polymerases. We have demonstrated that RSC complex interacts with RNA polymerases I and III. These results strongly suggested an implication of RSC in transcriptional regulation. We focused on the interaction between Rsc4 subunit of RSC and ABC27, a subunit shared by the three eukaryotic RNA polymerases. We mapped the interaction domain of Rsc4 with ABC27 within the last 68 residues. A thermosensitive strain expressing a mutant Rsc4 protein carrying 13 copies of the c-Myc epitope inserted at the C-terminus was created. In order to characterise potential pol II defects, we performed genome profiling experiments using DNA microarrays. Surprisingly, the vast majority of the upregulated genes localised to the chromosome XII, spreading all along in a non-polar manner. This observation contrasts with those performed previously on other SWI/SNF and RSC mutants. We propose that the presence of the rDNA cluster on chromosome XII could be responsible for this peculiar transcriptional pattern. We have seen defects in the 35S RNA maturation but have been unable to clearly establish defects on pol I and pol III transcription.

English title :

Chromatin and transcription : Study of a mutant of the chromatin remodeling complex RSC.

Le complexe RSC est un des facteurs de remodelage de la chromatine capables de lever la barrière nucléosomale notamment lors de la transcription. Ce processus est effectué chez les eucaryotes par trois ARN polymérases (pol). Nous avons montré que le complexe RSC interagit avec les pol I et III. La protéine Rsc4 interagit par son domaine C-terminal avec la protéine ABC27, commune aux trois ARN polymérases. Nous avons isolé une mutation de la sous-unité Rsc4 qui abolit cette interaction. Les profils d'expression génomiques, établis par puces à ADN, ont permis de caractériser ses effets sur la transcription par la pol II. Curieusement, la majorité des gènes induits sont répartis sur le chromosome XII de manière non polaire. La présence de l'ADN ribosomique sur ce chromosome suggère un lien avec ce comportement particulier. Par ailleurs, la maturation de l'ARN 35S, transcrit par la pol I, est altérée, mais nous n'avons pas pu caractériser des défauts de transcription par les pol I et III.

The RSC complex is one of the chromatin remodeling complexes that helps the transcription machinery to overcome the nucleosomal barrier. Eukaryotic transcription is carried out by three RNA polymerases. We have demonstrated that RSC complex interacts with pol I and III. The Rsc4 protein interacts by its C-terminal domain with the ABC27 protein, a subunit shared by the three eukaryotic RNA polymerases. We have isolated a mutation in the Rsc4 subunit that abolishes this interaction. We performed genome profiling experiments using DNA microarrays to characterise pol II transcription defects. Surprisingly, the vast majority of the upregulated genes localised to the chromosome XII, spreading all along in a non-polar manner. We propose that the presence of the rDNA cluster on chromosome XII could be responsible for this peculiar transcriptional pattern. We have seen defects in the 35S RNA maturation but have been unable to clearly establish defects on pol I and pol III transcription.