

Effet de la topologie de l'ADN du promoteur sur la transcription par
l'ARN polymérase II

Par

Yanie Porlier

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 2001



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-80633-2

Le 11 avril 2001 , le jury suivant a accepté ce mémoire dans sa version finale.
date

Président-rapporteur: M. Denis LeBel
Département de biologie

Membre: M. Luc Gaudreau
Département de biologie

Membre: M. Benoît Coulombe
Département de biologie

SOMMAIRE

La transcription des gènes est un processus relativement simple chez les organismes procaryotes. Une seule enzyme en est responsable, l'ARN polymérase (ARN pol) qui est composée de quatre sous-unités α_2 , β' et β . Afin de pouvoir transcrire, l'ARN polymérase procaryote a recours au facteur σ . Ensemble, ces cinq sous-unités forment l'holoenzyme procaryote fonctionnel en transcription.

Chez les organismes eucaryotes, la transcription des gènes est beaucoup plus complexe. D'une part, l'ADN est condensé sous forme de chromatine, ce qui constitue une première barrière pour les protéines impliquées dans la transcription des gènes. De plus, depuis que le génome humain a été séquencé, plus de 30 000 gènes ont été répertoriés. Ce ne sont pas tous les gènes qui sont exprimés dans la cellule. Selon le tissu, certains gènes seront exprimés, tandis que d'autres seront réprimés. Il existe trois classes de gènes chez les eucaryotes, les gènes de classe I, de classe II et de classe III. Les gènes de classe I codent pour des ARN ribosomiaux (ARNr) et les gènes de classe III codent principalement pour des ARN de transfert (ARNt). Chacune de ces classes de gènes possède sa propre enzyme de transcription. Il s'agit de l'ARN pol I et de l'ARN pol III, respectivement. Quant aux gènes de classe II, l'enzyme responsable de la synthèse des ARNm est l'ARN polymérase II. À la différence de l'ARN polymérase procaryote, l'ARN pol II est composée d'une dizaine de sous-unités et a recours à plusieurs autres facteurs de transcription pour être fonctionnelle.

L'ARNm contient toute l'information nécessaire pour mener à la production d'une protéine. Les protéines joueront différents rôles dans la cellule et sont essentielles à son fonctionnement. La transcription des gènes de classe II peut être décortiquée en plusieurs étapes soit la reconnaissance du promoteur génique et la formation d'un complexe de préinitiation à la transcription, l'ouverture du promoteur au site d'initiation de la transcription, l'initiation proprement dite qui consiste en la formation du premier lien

phosphodiester de l'ARNm, le dégagement du complexe d'élongation du promoteur et enfin l'élongation de l'ARNm.

En présence d'ATP, le complexe prétranscriptionnel est en mesure d'ouvrir le promoteur au site d'initiation de la transcription. La formation du complexe prétranscriptionnel et l'ouverture du promoteur nécessitent l'enroulement de l'ADN du promoteur autour de l'ARN pol II. Puisque l'enroulement de l'ADN joue un rôle important dans l'assemblage du complexe d'initiation, notre hypothèse est que la courbure naturelle de l'ADN du promoteur peut influencer la force transcriptionnelle basale du promoteur. Afin de vérifier cette idée, nous avons introduit une série de cinq adénines (A_5), reconnue pour induire une courbure d'un angle de 18° dans l'ADN, à différentes positions le long du promoteur majeur tardif de l'Adénovirus. Selon la position de la série d'adénines, nous observons une variation dans l'activité transcriptionnelle basale pour les promoteurs mutés, certains étant plus forts, d'autres plus faibles que le promoteur sauvage. Deux de nos promoteurs mutants, lesquels possèdent une série d'adénines immédiatement en aval de la boîte TATA (GML108; A_5 -23/-19) ou dans l'initiateur (GML162; A_5 -1/+4), ont une activité transcriptionnelle basale plus faible que le promoteur sauvage. La courbure présente dans le mutant de promoteur GML108 affecte la formation des complexes TBP-ADN et TBP-TFIIB-ADN, mais non l'assemblage des complexes contenant TFIIE, TFIIF et l'ARN pol II en plus de TBP et de TFIIB. Les résultats obtenus supportent la notion qu'une courbure induite dans l'ADN et l'enroulement de celui-ci jouent un rôle significatif dans l'initiation de la transcription et révèlent un nouveau mécanisme de régulation des gènes.

La régulation de la transcription est primordiale pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Un simple déséquilibre peut mener à de graves maladies tel le cancer. Il est donc important de comprendre les mécanismes impliqués dans la transcription afin de pouvoir développer des outils pouvant mener à des éventuelles thérapies géniques.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement Benoit Coulombe pour avoir cru en moi, pour son encadrement ainsi que ses précieux conseils. Je tiens aussi à remercier la merveilleuse équipe du laboratoire avec laquelle j'ai beaucoup appris, mais aussi eu du plaisir à travailler. Je remercie François Robert pour sa patience, sa formation et son amitié, Maxime Douziech pour son aide technique et ses idées, Diane Forget pour sa précieuse aide à tous les niveaux (technique, scientifique et morale), son amitié et les nombreuses discussions. Je remercie aussi les autres membres du laboratoire Olivier Maes, Marie-France Langelier, Valérie Dion pour sa contribution, Vincent Trinh et Diane Bourque pour leur amitié.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vi
LISTE DES FIGURES.....	ix
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Transcription des gènes de classe II.....	1
1.1.1 Description d'un gène de classe II.....	1
1.2 Initiation de la transcription.....	3
1.2.1 ARN polymérase II.....	3
1.2.2 TFIID	14
1.2.3 TFIIB	18
1.2.4 TFIIA	21
1.2.5 TFIIF.....	23
1.2.6 TFIIE.....	29
1.2.7 TFIIH	31
1.3 Élongation de la transcription	38
1.4 Régulation de la transcription	41
1.5 Topologie de l'ADN.....	45
1.5.1 Modèles.....	46
1.5.2 Séquences courbées et flexibles	50
1.5.3 Rôle de la séquence d'ADN en transcription.....	52
1.6 Objectif	53
CHAPITRE 2 -EFFET D'UNE COURBURE ARTIFICIELLE DANS L'ADN DU PROMOTEUR SUR LA TRANSCRIPTION PAR L'ARN POLYMÉRASE II	55
2.1 Préambule	55
3.2 Article	56
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	78
BIBLIOGRAPHIE.....	82

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNdb	ADN double brin
ADN-H	ADN hétéronome
ADNk	ADN kinétoplastique
ADNsb	ADN simple brin
ARN pol	ARN polymérase
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
aTBP	<i>Arabidopsis</i> TBP
BRE	<i>TFIIB recognition element</i>
CAK	<i>CDK-activating kinase</i>
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CKII	<i>Casein kinase II</i>
CS	Syndrôme de Cockayne
CTD	<i>C-terminal domain</i>
DPE	<i>Downstream promoter element</i>
DSIF	<i>DRB sensitivity-inducing factor</i>
dTAF	TAF de Drosophile
dTBP	TBP de Drosophile
FACT	<i>Facilitates chromatin transcription</i>

LISTE DES ABRÉVIATIONS (suite)

FGT	Facteur généraux de transcription
H2	Histone 2
HAT	Histone acétyltransférase
HDAC	Histone déacétylase
HIR	<i>Homomeric interaction region</i>
HMG	<i>High mobility group</i>
hTAF	TAF humain
hTBP	TBP humain
Inr	<i>Initiator</i>
Ins	<i>Insulator</i>
Kb	Kilo paire de bases
kDa	Kilodalton
MDa	Megadalton
NC	<i>Negative factor</i>
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
NRE	<i>Negative regulatory element</i>
NURF	<i>Nucleosome remodeling factor</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Pb	Paire de bases
PC	<i>Positive cofactor</i>
PCAF	<i>p300/CBP-associated factor</i>
P-TEFb	<i>Positive transcription elongation factor b</i>
Pu	Purines
Py	Pyrimidines

LISTE DES ABRÉVIATIONS (suite)

RAP	<i>RNA polymerase II-associated protein</i>
Rpb	<i>RNA polymerase B</i>
SAGA	<i>Spt/Ada/Gcn5 acetyltransferase complex</i>
SII	Facteur d'élongation SII
SNF	<i>Sucrose non-fermenting</i>
Srb	<i>Suppressor of RNA polymerase B</i>
SWI	<i>Mating-type switching</i>
TAF _{II}	<i>RNA polymerase II TBP-associated factor</i>
TBP	<i>TATA box-binding protein</i>
TFII	<i>RNA polymerase II transcription factor</i>
TTD	Trichothiodystrophie
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
yTAF	TAF de levure
yTBP	TBP de levure

LISTE DES FIGURES

1. Description d'un gène de classe II	2
2. Architecture de l'ARN polymérase II de levure. Le squelette des 10 sous-unités est schématisé par des rubans. Les trois vues sont reliées par des rotations de 90° tel qu'indiqué. L'ADN (bleu) est situé en aval du site catalytique de l'ARN pol II tel qu'indiqué par des études de cristallographie électronique. L'ion magnésium du site catalytique de l'ARN pol II est représenté par une sphère rose. La boîte située dans le coin supérieur droit contient le code des couleurs correspondant aux 10 sous-unités (Cramer <i>et al.</i> , 2000).	5
3. Holoenzyme de levure formé du médiateur et l'ARN pol II. Le médiateur est la forme allongée avec une tête (h), un domaine central (m) et une queue (t). La tête contacte l'ARN pol II directement et le domaine central contact le CTD représenté par le point noir (Asturias <i>et al.</i> , 1999).	10
4. Schématisation de l'assemblage séquentiel pour la formation du complexe de préinitiation. A) Reconnaissance de la boîte TATA par TBP et stabilisation du complexe par TFIIB, B) recrutement de l'ARN polymérase II par TFIIF et complétion du complexe par l'arrivée de TFIIE et TFIIH.....	12
5. Schématisation de la formation du complexe prétranscriptionnel par le recrutement de l'holoenzyme.....	13
6. Schématisation de l'intraligature présente dans le facteur général de transcription TFIIB. Le domaine C-terminal est représenté par la lettre C et le domaine N-terminal par la lettre N (Bangur <i>et al.</i> , 1999).....	20
7. Schématisation des domaines et fonctions des sous-unités A) RAP30 et B) RAP74 de TFIIF.....	24
8. Structure du dimère RAP30 (2-119)-RAP74 (2-172) formant un triple cylindre-β (Gaiser <i>et al.</i> , 2000)	25

LISTE DES FIGURES (suite)

9. Modèle d'enroulement induit par la présence de TFIIF (Robert *et al.*, 1998)27
10. Structure du facteur général de transcription TFIIH montrant la localisation des sous-unités et leurs interactions (Schultz *et al.*, 2000)32
11. Modèle d'ouverture du promoteur par l'hélicase XPB/p89 de TFIIH (Douziech *et al.*, 2000).....37
12. Schématisation d'un Insulator et de son rôle dans l'inhibition d'enhancers non-spécifiques à un gène. E, enhancer; INS, Insulator (Udvardy 1999)44
13. Conformation de l'ADN en fonction de sa séquence selon la disposition des séries d'adénines (Hagerman 1985).....45
14. Représentation schématique des principaux angles de rotations retrouvés au niveau des dinucléotides ou au sein d'une paire de bases (Dickerson *et al.*, 1989).....47
15. Modèle des courbures. a) Modèle des jonctions (*Kink model*) de Crick et Klug, et b) *Wedge model* de Trifonov (Suzuki *et al.*, 1996)48
16. Représentation du changement conformationnel de l'ADN selon le modèle des jonctions (Sinden 1994).....49
17. Schématisation du troisième lien hydrogène non Watson-Crick entre le N6 de l'adénine et le O4 de la thymine suivante (Nelson *et al.*, 1987)51

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Transcription des gènes de classe II chez les métazoaires

1.1.1 Description d'un gène de classe II (métazoaires)

Un gène de classe II peut être subdivisé en deux régions principales: la région promotrice (promoteur) et la région transcrite. La région transcrite est celle qui sera utilisée comme matrice pour la synthèse du pré-ARNm. Ce pré-ARNm subira des modifications telles que le coiffage, l'épissage et la polyadénylation, avant d'être exporté au cytoplasme pour la traduction. Le site d'initiation de la transcription (site +1) constitue le premier nucléotide du pré-ARNm et délimite généralement le promoteur de la région transcrite. Le promoteur contient plusieurs éléments de séquence pouvant jouer un rôle dans la régulation de la transcription ou comme port d'attache pour les protéines impliquées dans l'initiation de la transcription. Les éléments responsables de la régulation transcriptionnelle sont des régulateurs proximaux et distaux (enhancers, silencers). Les éléments servant de port d'attache sont la boîte TATA, l'initiateur (Inr), l'élément BRE (*TFIIB recognition element*) et l'élément DPE (*downstream promoter element*) (Fig. 1). La boîte TATA et l'Inr constituent le "core" du promoteur, c'est-à-dire qu'à eux seuls, ils sont en mesure de supporter la transcription tant *in vivo* qu'*in vitro* (Hahn 1998). Certains promoteurs peuvent avoir à la fois une boîte TATA et un Inr, l'un ou l'autre ou aucun des deux (Smale 1994).

La boîte TATA est un élément de séquence de 8 pb dont la séquence consensus est TATAA/tAa/t et est située à 30 pb en amont du site +1. L'extrémité 5' de la boîte TATA (T-A-T-A) est considérée comme étant très flexible par la présence du dinucléotide TA (Kim, Y. *et al.*, 1993; Juo *et al.*, 1996; El Hassan et Calladine 1996; Dickerson 1998). Cette flexibilité serait essentielle pour accepter l'encombrement stérique de certains acides aminés de la protéine TBP (*TATA binding protein*). Ceci pourrait expliquer pourquoi l'extrémité 5'

de la boîte TATA est invariable dans sa séquence (Juo *et al.*, 1996). Quant à l'extrémité 3' de la boîte TATA (a/t-A-a/t), celle-ci est plus variable. Selon sa séquence, elle peut être flexible (t-A-t) ou courbée et rigide (a-A-a) (Koo *et al.*, 1986; Nelson *et al.*, 1987; El Hassan et Calladine 1996; Dickerson 1998). La boîte TATA, grâce à sa séquence, adopterait une conformation particulière pouvant être reconnue spécifiquement par TBP (Juo *et al.*, 1996; Grove *et al.*, 1998; de Souza *et al.*, 1998, Davis *et al.*, 1999). La distance entre la boîte TATA et le site +1 est cruciale pour une initiation précise par l'ARN pol II au site

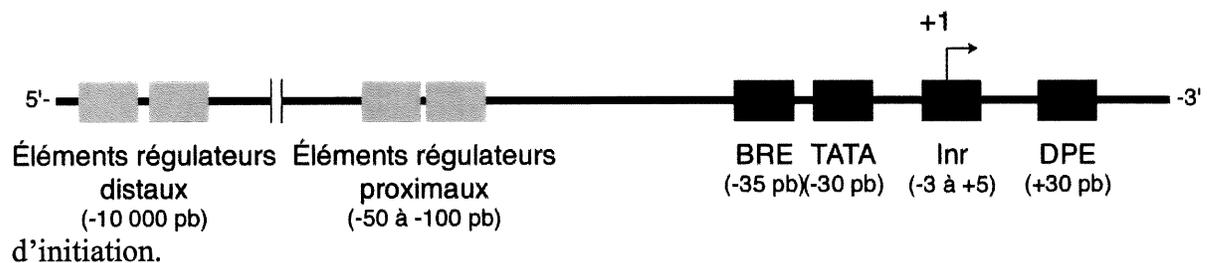


Figure 1. Description d'un gène de classe II

L'initiateur (Inr) chevauche le site d'initiation de la transcription et s'étend de -3 à +5. La séquence consensus PyPyANt/aPyPy est plus variable que celle de la boîte TATA. L'Inr, tout comme l'élément DPE situé à 30 pb en aval du site +1 (Burke et Kadonaga 1996), deviennent essentiels pour la transcription *in vivo* lorsque les promoteurs n'ont pas de boîte TATA ou possèdent une boîte TATA non consensus (Struhl et Moqtaderi 1998; Hahn 1998). L'Inr, via des interactions avec différentes protéines, a pour fonction de positionner l'ARN pol II adéquatement pour l'initiation de la transcription. L'élément DPE, dont la séquence consensus est PuGa/tCGTG, est retrouvé dans presque tous les promoteurs sans boîte TATA chez la drosophile (Burke et Kadonaga 1996, 1997). Son rôle serait aussi important que la boîte TATA. Il en est de même pour la distance qui le sépare de l'Inr afin d'initier la transcription au site +1 (Kutach et Kadonaga 2000).

L'élément BRE, dont la séquence consensus est g/cg/cg/aCGCC, a été découvert par Reinberg et collaborateurs (1998). Il est reconnu de façon spécifique par le facteur général de transcription TFIIB. La localisation de l'élément BRE, immédiatement en amont de la boîte TATA, pourrait impliquer TFIIB dans l'orientation que doit prendre TBP lors de sa liaison à l'ADN (Littlefield *et al.*, 1999). En effet, deux orientations sont possibles pour la liaison de TBP à la boîte TATA (Cox *et al.*, 1997). Une seule des orientations mène à la formation d'un complexe de préinitiation fonctionnel.

Quant aux séquences régulatrices, celles-ci sont généralement situées de 50-100 pb en amont du site +1 (régulateurs proximaux) ou à de grandes distances (pouvant aller jusqu'à plusieurs kpb) en amont ou en aval du site +1 (régulateurs distaux ou enhancers) (Mitchell et Tjian 1989; Ptashne 1988). Ces éléments régulateurs lient de façon gène-spécifique soit des activateurs ou des répresseurs transcriptionnels. Cette liaison permet de moduler de façon positive ou négative différentes étapes de la transcription dont entre autres le recrutement des facteurs généraux de transcription, de l'ARN pol II au promoteur ou la vitesse d'élongation de la transcription par l'ARN pol II.

1.2 Initiation de la transcription

1.2.1 ARN polymérase II

L'enzyme responsable de la synthèse de l'ARNm est l'ARN pol II. L'ARN pol II est composée de 10 à 12 sous-unités (Rpb1-Rpb12), selon l'organisme. Les trois plus grandes sous-unités de l'ARN pol II, Rpb1 (200kDa), Rpb2 (150kDa) et Rpb3 (45kDa) ainsi que Rpb11 forment le "core" de l'ARN pol II au même titre que leurs homologues procaryotes, c'est-à-dire les sous-unités β' (Rpb1), β (Rpb2) et α_2 (Rpb3 et Rpb11) de l'ARN pol procaryotes (Young 1991). Chez les eucaryotes, de la levure à l'humain, presque toutes les sous-unités de l'ARN pol II sont structurellement conservées (McKune *et al.*, 1995). Chez

la levure, dix des douze sous-unités sont essentielles à la survie de la cellule, ce qui suggère le même raisonnement pour les organismes plus évolués.

Il est connu que les trois plus grosses sous-unités Rpb1, Rpb2 et Rpb3 jouent le rôle de charpente pour les autres sous-unités de l'ARN pol II (Kolodziej et Young 1991). Récemment, des études utilisant les techniques de diffraction des électrons et des rayons X ont permis de caractériser la structure de l'ARN pol II (Fig. 2) (Cramer *et al.*, 2000). La sous-unité Rpb1, capable de lier l'ADN, et Rpb2, capable de lier les nucléosides triphosphates, s'assemblent pour former une crevasse au fond de laquelle se trouve le site catalytique de l'ARN pol II. La grandeur de la crevasse est suffisante pour lier 9 pb de l'hybride ARN-ADN, permettant alors l'alignement de l'extrémité 3' de l'ARNm avec l'ion Mg^{2+} situé dans le fond du site catalytique de l'ARN pol II. À l'entrée de la crevasse, les sous-unités Rpb1, Rpb5 et Rpb9 forment une structure mobile qualifiée de mâchoire : Rpb1 et Rpb9 formant la partie supérieure et Rpb5 formant la partie inférieure de la mâchoire. Cette mâchoire amovible aurait pour fonction de placer l'ADN (~20 pb) adéquatement en aval du site catalytique de l'ARN pol II. Dans la même région de la crevasse, une autre structure amovible, la pince, est formée par la partie N-terminale de Rpb1, de Rpb6 et de la partie C-terminale de Rpb2. Le rôle de la pince serait de stabiliser l'hybride ADN-ARN présent dans le site catalytique de l'ARN pol II, augmentant la stabilité du complexe d'élongation. La longueur de l'ADN utilisé dans cet expérience ne permet pas de définir la trajectoire qu'emprunterait celui-ci au fur et à mesure de la synthèse de l'ARNm. En effet, l'ADN une fois sortie du site catalytique se heurterait à un mur constitué de Rpb3, Rpb10, Rpb11 et Rpb12 liés au sous-complexe Rpb1-Rpb2. Deux hypothèses sont envisageables, soit que l'ADN passe par-dessus le mur ou le contourne. Par contre, la présence d'un sillon à la base de la pince servirait de porte de sortie pour l'ARNm naissant. Le fait que les sous-unités Rpb1, Rpb2, Rpb3 et Rpb11 aient des homologues dans l'ARN pol I et l'ARN pol III, et que les sous-unités Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 et Rpb 12 soient communes aux trois ARN polymérase (Young 1991; Coulombe et Burton 1999), suggèrent un mécanisme similaire pour la synthèse des ARNr et ARNt.

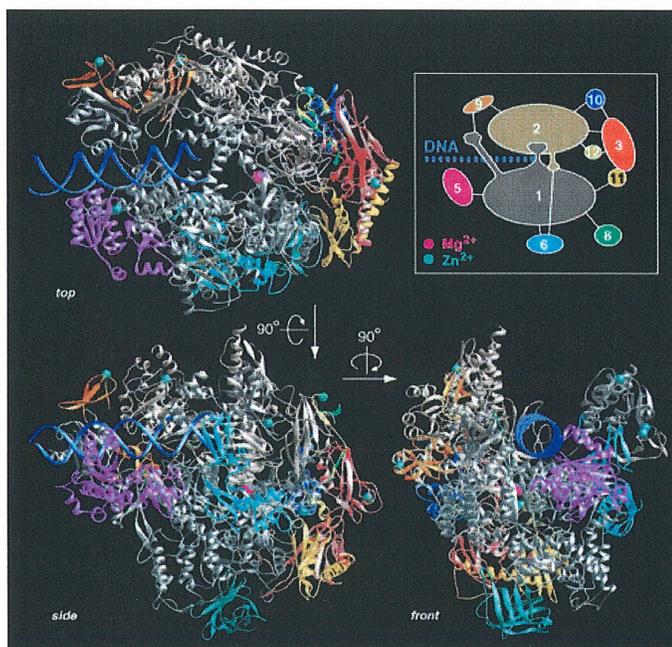


Figure 2. Architecture de l'ARN polymérase II de levure. Le squelette des 10 sous-unités est schématisé par des rubans. Les trois vues sont reliées par des rotations de 90° tel qu'indiqué. L'ADN (bleu) est situé en aval du site catalytique de l'ARN pol II tel qu'indiqué par des études de cristallographie électronique. L'ion magnésium du site catalytique de l'ARN pol II est représenté par une sphère rose. La boîte située dans le coin supérieur droit contient le code des couleurs correspondant aux 10 sous-unités (Cramer *et al.*, 2000).

Rpb9, en plus de former la mâchoire supérieure de l'ARN pol II, influence la sélection du site d'initiation de la transcription ainsi que l'élongation de la transcription. En effet, des études démontrent que la transcription faite en absence de Rpb9 est initiée à partir d'un nouveau site d'initiation situé en amont du site original *in vitro* et *in vivo* (Hull *et al.*, 1995). Certaines mutations présentes dans le gène Rpb9 modifieraient aussi le site d'initiation de la transcription (Furter-Graves *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1996). Le domaine C-terminal de Rpb9 ainsi que des interactions entre le facteur général de transcription TFIIB et Rpb9 seraient impliqués dans la sélection du site +1 (Sun *et al.*, 1996). Au cours de l'élongation, des facteurs d'élongation viennent aider l'ARN pol II à relever certains obstacles présents sur l'ADN. Le facteur d'élongation TFIIS ou SII (voir liste des abréviations) nécessite la présence de Rpb9 pour exercer sa fonction (Awrey *et al.*, 1997). La présence de Rpb6 influencerait aussi l'interaction entre TFIIS (voir section 2.3) et l'ARN pol II (Ishiguro *et al.*, 2000).

Le rôle qu'exercent Rpb4 et Rpb7 est de plus en plus connu. Rpb4 et Rpb7 forment un sous-complexe apte à lier l'ARN pol II dans le fond de la crevasse formée de Rpb1-Rpb2 (Asturias *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 1998). En absence de Rpb4-Rpb7, l'ARN pol II n'est pas en mesure d'initier correctement la transcription, ce qui suggère un rôle dans la sélection du site +1 pour ce sous-complexe. Le sous-complexe Rpb4-Rpb7 serait aussi impliqué dans la stabilisation de l'ARN pol II aux sites de pause (Rasmussen et Lis 1995). Malgré le fait que le gène *RPB4* ne soit pas essentiel, la présence de la protéine Rpb4 devient essentielle en conditions stressantes améliorant l'interaction de Rpb7 à l'ARN pol II. Cette interaction Rpb7-ARN pol II stabilise davantage l'interaction de l'ARN pol II avec l'ADN.

La sous-unité Rpb1 est unique en son genre en ce sens qu'elle possède un domaine C-terminal (CTD) hautement conservé chez les eucaryotes. Le CTD est composé d'un heptapeptide (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser) répété 26 fois chez la levure et 52 fois chez l'humain (Dahmus 1996). Il semble donc y avoir une corrélation entre le nombre de répétitions de l'heptapeptide et la complexité du génome. Il peut survenir des délétions dans

le CTD modifiant le nombre de répétitions de l'heptapeptide. Des études ont démontré que chez la levure, l'ARN pol II dont le CTD contient de 11-12 répétitions de l'heptapeptide possède une sensibilité à la température (chaude et froide); lorsque le nombre de répétitions est inférieur à 10, il y a mort de la cellule (Young 1991). Selon l'organisme et la longueur de la délétion, différents phénotypes sont observés. Le CTD est donc essentiel à la viabilité de la cellule (Nonet *et al.*, 1987).

Le CTD peut être phosphorylé par différentes kinases telles que cdc2, cdk8/Srb10-Srb11, cdk9 et cdk7, la kinase de TFIIH. Le degré de phosphorylation du CTD joue un grand rôle sur sa fonction et celle de l'ARN pol II. Par exemple, lorsque le CTD est hypophosphorylé, l'ARN pol II, nommé alors ARN pol IIA, est préférentiellement recrutée au complexe de préinitiation (Lu *et al.*, 1991). Par ailleurs, l'ARN pol II associée au complexe d'élongation est retrouvée sous une forme hyperphosphorylée appelée ARN pol IIO. Il a donc été suggéré que la phosphorylation du CTD entraînerait le dégagement du promoteur brisant, des liens entre certains facteurs généraux de transcription tels que TBP et TFIIE et le CTD non-phosphorylé de l'ARN pol II. Il a été démontré dans un système entièrement reconstitué qu'il existe des gènes CTD-indépendents. La présence d'une boîte TATA est responsable de cette indépendance du CTD (Li et Kornberg 1994; Buermeier *et al.*, 1995).

Depuis plusieurs années, des études ont démontré que l'ARN pol II, *in vivo*, se retrouve dans un méga complexe protéique nommé holoenzyme qui répond à l'activation de la transcription autant *in vivo* qu'*in vitro* (Kim, Y.-J. *et al.*, 1994; Koleske et Young 1994). La composition de l'holoenzyme varie selon la technique de purification utilisée. De façon générale, l'holoenzyme est constitué de l'ARN pol II, de certains facteurs généraux de transcription, à l'exception de TFIID et de TFIIE, d'un sous complexe médiateur (Kim, Y.-J. *et al.*, 1994; Koleske *et al.*, 1994; Thompson et Young 1995) et, dans certains cas, du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Wilson *et al.*, 1996). Le médiateur fait parti de l'holoenzyme par les interaction entre les Srb et le CTD de l'ARN pol II.

Le médiateur a été découvert chez la levure par les laboratoires de Roger Kornberg (Flanagan *et al.*, 1991) et de Richard Young (Thompson et Young 1995) via la découverte des protéines Srb (*Suppressor of RNA polymerase b*). En fait, le "core" du médiateur (1,5 MDa) contient une vingtaine de polypeptides dont les protéines Srb2, 4, 6 et 7, les protéines Med1, 2, 4, 6, 7 et 8 et les protéines Gal11, Sin4, Rgr1 et Rox3 (Myers *et al.*, 1998). Il existe un sous-complexe contenant les Srb8, 9, 10 et 11 pouvant faire parti, selon les chercheurs, du médiateur (Hengartner 1995)

Les protéines Srb2, 4, 5 et 6 forment un complexe stable *in vitro*. L'organisation du noyau est la suivante: Srb2 lie Srb5, tandis que Srb4 lie Srb6. L'interaction de Srb2 avec Srb4 relie ces deux hétérodimères. Srb2-Srb5 est impliqué dans la stabilité du complexe prétranscriptionnel (Thompson *et al.*, 1993) et Srb4-Srb6 est essentiel pour la transcription de certains gènes (Thompson et Young 1995). En effet, l'inactivation des gènes *SRB4*, *SRB6* ainsi que *SRB7* résulte en une diminution draconienne de la synthèse des ARNm. Les gènes *SRB2* et *SRB5* ne sont pas essentiels, mais importants pour l'activité de l'ARN pol II.

Les protéines Med forment un sous-complexe relié d'un côté au complexe Srb, via Med6, (Myers et Young 1995) et de l'autre côté au sous-complexe Srb10/Srb11, via Med1 (Balciunas *et al.*, 1999). Le troisième groupe de protéines contient Gal11, Sin4, Rgr1 et Rox3 et est relié aux Srb via Rgr1 (Li *et al.*, 1995). Les protéines Gal11, Sin4, Rgr1 et Rox3 sont impliquées à la fois dans l'activation et la répression de la transcription (Chen *et al.*, 1993; Stillman *et al.*, 1994). Selon Han et collaborateurs (1999), le sous-complexe Rgr1 recevrait les signaux en provenance des activateurs/répresseurs les transmettant, par la suite, aux sous-complexes Srb et Med. Ceux-ci moduleraient l'activité de l'ARN pol II selon les signaux reçus. Chaque protéine du sous-complexe Rgr1 serait activateur/répresseur-spécifique.

Le médiateur découvert par le laboratoire de Richard Young contient d'autres protéines Srb dont les Srb8, 9, 10 et 11, tandis que le médiateur découvert par le laboratoire de Roger

Kornberg ne les contient pas. Srb10 et Srb11 forment une kinase cycline-dépendante où Srb10 est la kinase et Srb11 la cycline (Cdk8-cyclinC chez l'humain). La kinase Srb10/Srb11 est apte à phosphoryler le CTD aux mêmes résidus que la kinase cdk7 de TFIIH (Hengartner *et al.*, 1995). Or, la phosphorylation du CTD par la kinase cdk7 se fait lorsque l'ARN pol II est recrutée dans le complexe de préinitiation, ce qui permet à l'ARN pol II de faire la transition entre l'initiation et l'élongation de la transcription. La phosphorylation du CTD par Srb10/Srb11, quant à elle, a lieu avant que l'ARN pol II soit recrutée au complexe de préinitiation, ce qui suggère un rôle négatif pour cette kinase. Cependant, selon le moment où le CTD est phosphorylé, l'activité de la kinase Srb10/Srb11 peut être positive. Les Srb8 et 9 servent de point d'ancrage entre le médiateur et Srb10/Srb11 (Myers et Young 1998).

Des études de microscopie électronique et de traitements d'images ont montré que le médiateur de la levure prend la forme d'un triangle dont les pointes correspondent à un domaine nommé tête, domaine central et queue (Fig. 3). Seule la tête et le domaine central lient l'ARN pol II. Le domaine central contacte le CTD, tandis que la tête se lie directement à l'ARN pol II. Puisque les Srb se lient au CTD, il est possible d'envisager que les Srb constituent le domaine central du médiateur. Ces deux sites de liaison sont requis pour une interaction stable entre le médiateur et l'ARN pol II (Asturias *et al.*, 1999). Il était déjà connu que le médiateur se liait au CTD via les Srb (Nonet et Young 1989; Thompson *et al.*, 1993). Le deuxième point de contact avec l'ARN pol II est totalement nouveau. La structure et le mode d'interaction du médiateur avec l'ARN pol II sont conservés de la levure à l'humain (Asturias *et al.*, 1999).

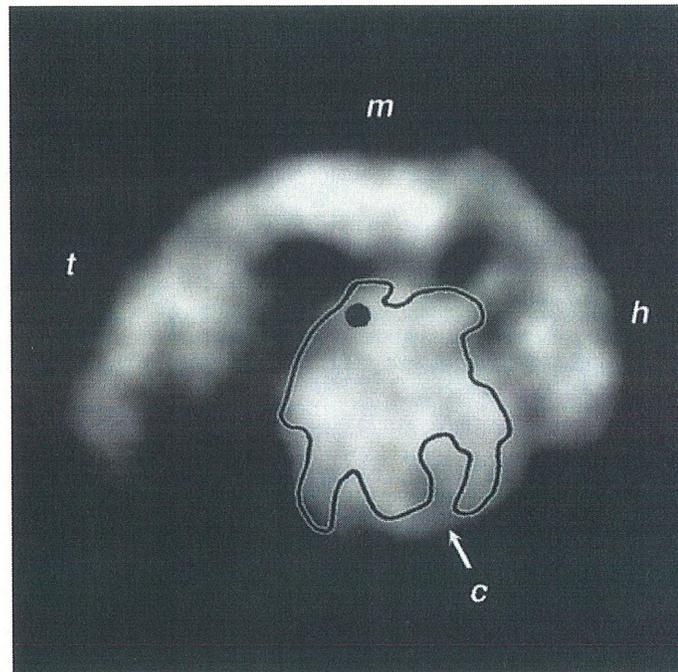


Figure 3. Holoenzyme de levure formé du médiateur et l'ARN pol II. Le médiateur est la forme allongée avec une tête (h), un domaine central (m) et une queue (t). La tête contacte l'ARN pol II directement et le domaine central contact le CTD représenté par le point noir (Asturias *et al.*, 1999).

Avec tout ce qui est maintenant connu sur le médiateur, il est plus aisé de comprendre son rôle de co-facteur dans l'activation et la répression de la transcription *in vivo* et *in vitro*. En effet, un système hautement purifié contenant TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH et l'ARN pol II, ne répond pas à l'activation de la transcription en présence d'activateurs. Par contre, l'ajout du médiateur permet une réponse aux activateurs, ce qui lui a donné le rôle de co-activateur (Kim, Y. *et al.*, 1994). Le médiateur est aussi en mesure de stimuler de 5-10 fois la transcription basale et de stimuler de 30-50 fois la phosphorylation du CTD par la kinase cdk7 de TFIIH (Björklund et Kim 1996). Récemment, un nouveau rôle a été attribué au médiateur l'impliquant dans la désorganisation de la chromatine via une activité acétyltransférase découverte dans la protéine Nut1, une nouvelle sous-unité du médiateur (Lorch *et al.*, 2000).

Malgré toutes les fonctions que remplit l'ARN pol II, celle-ci n'est pas en mesure d'initier correctement la transcription en l'absence de protéines accessoires nommées facteurs généraux de transcription (FGT) dont TFIIA, TFIIB, TFIID (TBP+TAF_{II}), TFIIE, TFIIF et TFIIH (revue dans Orphanides 1996; Hampsey 1998). Afin de former le complexe de préinitiation sur le promoteur génique, l'assemblage des FGT et de l'ARN pol II peut se faire de deux façons, soit par un assemblage séquentiel (Fig. 4), soit par recrutement de l'holoenzyme (Fig. 5). L'assemblage séquentiel *in vitro* a permis de caractériser le rôle de chacun des facteurs généraux de transcription dans le processus transcriptionnel.

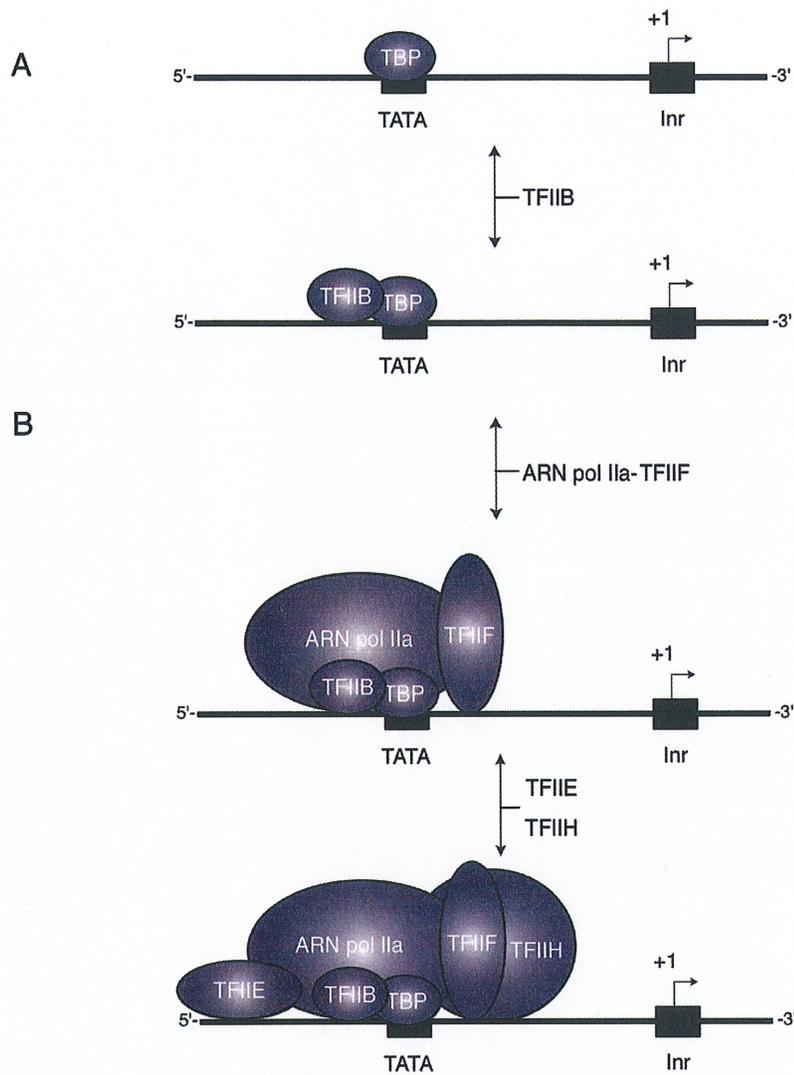


Figure 4. Schématisation de l'assemblage séquentiel pour la formation du complexe de préinitiation. A) Reconnaissance de la boîte TATA par TBP et stabilisation du complexe par TFIIB, B) recrutement de l'ARN polymérase II par TFIIF et complétion du complexe par l'arrivée de TFIIE et TFIIH

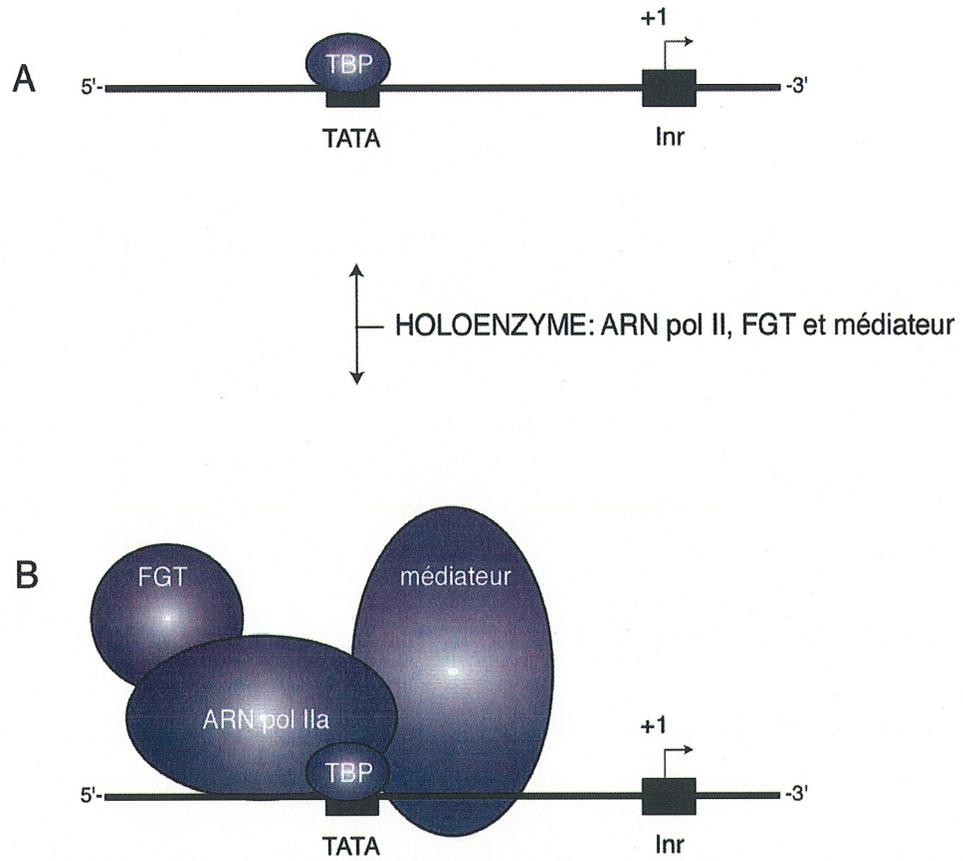


Figure 5. Schématisation de la formation du complexe prétranscriptionnel par le recrutement de l'holoenzyme

1.2.2 TFIID

La première étape menant à la formation du complexe prétranscriptionnel, peu importe s'il s'agit d'un assemblage séquentiel ou du recrutement de l'holoenzyme, est la reconnaissance du promoteur. Le facteur général de transcription TFIID est responsable de cette reconnaissance. TFIID est un complexe protéique de 700 kDa composé de la protéine TBP (*TATA-binding protein*) et de 10 à 12 TAF_{II} (*TBP-associated factor*). TBP et les TAF_{II} sont des protéines hautement conservées au cours de l'évolution de la levure à l'humain ainsi que dans d'autres complexes, SL1 et TFIIB, impliqués dans la transcription par l'ARN pol I et l'ARN pol III respectivement (Hampsey 1998; Lee et Young 1998). TFIID est donc un facteur important chez tous les organismes eucaryotes et pour les trois classes de gènes.

TBP est une petite protéine dont sa masse moléculaire varie de 22 kDa chez *Arabidopsis* (aTBP), 27 kDa chez la levure (yTBP) à 38 kDa chez l'humain (hTBP) et la drosophile (dTBP). La séquence en acides aminés de TBP montre une structure symétrique composée de deux domaines C-terminaux répétés imparfaitement et de façon inversée, et de deux domaines N-terminaux. La structure de TBP a l'allure d'une selle de cheval où le côté concave de la selle lie l'ADN, tandis que le côté convexe sert de support pour d'autres protéines telles que les TAF_{II} (Kim, J.L. *et al.*, 1993).

Le domaine C-terminal de TBP est grandement conservé à travers les organismes tel que démontré par la forte homologie de séquence entre aTBP, hTBP et yTBP (Peterson *et al.*, 1990; Lieberman *et al.*, 1991; Juo *et al.*, 1996). TBP reconnaît de façon spécifique la boîte TATA et s'y lie par son domaine C-terminal. Le domaine N-terminal de TBP quant à lui, diverge énormément d'un organisme à l'autre et son rôle reste encore très obscur quoiqu'il semblerait être impliqué dans des interactions TBP-activateurs (Peterson *et al.*, 1990; Lieberman *et al.*, 1991). Grâce à la grande homologie de séquence et de structure de TBP chez divers les organismes, il est possible d'interchanger cette protéine d'un organisme à l'autre sans affecter la transcription (Hampsey 1998).

Bien qu'il soit possible de purifier la protéine TBP active à partir d'un extrait cellulaire, TFIID représente la forme physiologique retrouvée *in vivo* (Struhl et Moqtaderi 1998). Cependant, Wu et collaborateurs (1998) soutiennent que TBP pourrait se retrouver libre dans la cellule et supporter la transcription *in vivo*. Comme TBP, les TAF_{II} sont phylogénétiquement conservés de la levure à l'humain. Les TAF_{II}, au nombre de 10 à 12, ont une masse moléculaire allant de 20kDa à 250kDa chez l'humain. Parmi les TAF_{II} présents dans TFIID, yTAF_{II}60, yTAF_{II}17(20) et yTAF_{II}61(68), et leurs homologues humain et drosophile, forment un octamère TAF_{II}-histone-like grâce à leur motif-histone H4, H3 et H2B, respectivement (revue dans Orphanides 1996; Michel *et al.*, 1998; Struhl et Moqtaderi 1998). Cet octamère TAF_{II}-histone-like se retrouve dans d'autres complexes tels que le complexe histone acétyltransférase SAGA chez la levure, et PCAF chez l'humain (voir section 3). Les TAF_{II}-histones-like sont généralement requis pour la transcription *in vivo* et les interactions présentes entre les TAF_{II}-histones-like sont primordiales pour la stabilité de l'octamère (Michel *et al.*, 1998). Il est possible d'imaginer que l'octamère TAF_{II}-histone-like constitue le "core" des complexes TFIID et SAGA/PCAF. L'assemblage des autres composantes vers l'un ou l'autre de ces complexes pourrait être sous le contrôle des régulateurs transcriptionnels. Un autre point commun des complexes TFIID et SAGA/PCAF est la présence d'une activité histone acétyltransférase (HAT) (Mizzen *et al.*, 1996). Dans le cas de TFIID, cette activité est médiée par yTAF_{II}130 (hTAF_{II}250 et dTAF_{II}250), tandis que Gcn5 et PCAF sont les histones acétyltransférases de SAGA et PCAF, respectivement (Struhl et Moqtaderi 1998).

Le rôle des TAF_{II} est très diversifié. D'une part, ils semblent être reliés à la désorganisation de la chromatine via différents complexes HAT. D'autre part, contrairement à TBP, les TAF_{II} sont en mesure de supporter l'activation de la transcription en établissant des interactions avec des activateurs spécifiques tels que NTF-1 et Sp1 permettant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle à certains promoteurs et jouant ainsi le rôle de co-activateurs (Smale *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1994; Struhl et Moqtaderi 1998). Toutefois, la présence des TAF_{II}, *in vivo*, n'est pas essentielle pour l'activation de la

transcription puisque le médiateur sert aussi d'intermédiaire entre la machinerie transcriptionnelle et les activateurs (Koleske et Young 1995; Oelgeschlager *et al.*, 1998; Michel *et al.*, 1998). Chez la levure, la présence des TAF_{II} est essentielle pour sa croissance, quoique la délétion de certains TAF_{II} n'affecte pas sérieusement l'activation de la transcription pour la majorité des gènes (Moqtaderi *et al.*, 1996). Les TAF_{II} peuvent aussi agir comme des cofacteurs négatifs (Liu *et al.*, 1998; Chalkley et Verrizerj 1999). En effet des études ont démontré que la région N-terminale de yTAF_{II}145 et des homologues hTAF_{II}250 et dTAF_{II}230 mime la structure de la boîte TATA (Nakatani *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1998). De par cette imitation, yTAF_{II}145 (hTAF_{II}250 dTAF_{II}230) est en mesure de lier la surface de TBP impliquée dans sa liaison à l'ADN, empêchant alors la liaison de TBP à la véritable boîte TATA. La dérégulation de cet assemblage serait possible par la présence d'activateurs tels que VP16 et E1A connus pour interagir directement avec TBP.

Plusieurs sous-unités de TFIID sont impliquées dans la sélection du promoteur. Bien que TBP reconnaisse spécifiquement la boîte TATA, certains TAF_{II} sont en mesure de reconnaître l'Inr et l'élément DPE (Chalkley et Verrijzer 1999; Burke et Kadonaga 1997). Ainsi, la reconnaissance du promoteur pourrait se faire différemment selon la présence ou non d'une boîte TATA consensus.

Par exemple, chez les promoteurs sans boîte TATA, TBP n'est pas en mesure de supporter la transcription et la présence de TFIID est essentielle. Le duplex TAF_{II}250-TAF_{II}150 et les TAF_{II}60 et TAF_{II}40 seraient sollicités pour reconnaître le promoteur via leur interaction avec l'Inr et l'élément DPE au même titre que TBP pour la boîte TATA (Burke et Kadonaga 1997; Chalkley et Verrijzer 1999). Chez ces promoteurs sans boîte TATA, TBP servirait uniquement comme protéine de support pour le complexe TFIID.

En ce qui concerne les promoteurs contenant une boîte TATA consensus, TBP est directement sollicité pour lier le promoteur et initier l'assemblage du complexe pré-transcriptionnel. La présence des TAF_{II} servirait à la sélection du site d'initiation et dans la

stabilité du complexe TFIID-ADN. Chalkley et Verrijzer (1999) ont démontré que le duplex TAF_{II}250-TAF_{II}150 lie l'Inr directement et sélectionne le site d'initiation. La liaison de TBP à la boîte TATA se fait dans le sillon mineur (Kim, J.L. *et al.*, 1993; Kim, Y. *et al.*, 1993) contrairement à la majorité des protéines liant l'ADN (Jones *et al.*, 1999). Lors de sa liaison, TBP induit deux flexions situées aux extrémités de la boîte TATA, courbant l'ADN d'un angle de 90° (Koo *et al.*, 1986; Kim, J.L. *et al.*, 1993; Kim, Y. *et al.*, 1993). L'amplitude de la courbure de l'ADN influence l'affinité de TBP pour la boîte TATA (Starr *et al.*, 1995; de Souza *et al.*, 1998; Grove *et al.*, 1998). De plus, Wolner et Gralla (2000a; 2000b) ont démontré que les séquences bordant la boîte TATA peuvent influencer la liaison de TBP à l'ADN.

Des études biochimiques et cristallographiques ont démontré que TBP peut se lier à l'ADN dans les deux orientations possibles (Cox *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 1998). Or, une seule orientation mène à la formation d'un complexe prétranscriptionnel fonctionnel. Différents modèles ont été proposés afin d'élucider la façon dont TBP se lie à la boîte TATA afin de dicter la polarité de la transcription. L'orientation de TBP sur la boîte TATA pourrait être dictée par la conformation que prend la boîte TATA due à sa séquence (Grove *et al.* 1998). La boîte TATA est composée d'une séquence non variable et flexible (extrémité 5') et d'une séquence variable (extrémité 3') pouvant être soit flexible, soit rigide et courbée (Nelson *et al.*, 1987; Dickerson *et al.*, 1989; Kim, J.L. *et al.*, 1993; Juo *et al.*, 1996; de Souza *et al.*, 1998). Des études ont déterminé que TBP se lie dans la bonne orientation dans un rapport 60:40 et ce pour la boîte TATA du promoteur majeur tardif de l'adénovirus (TATAAAA) ou du promoteur CYC1 (TATATAAA) (Cox *et al.*, 1997). Il semble donc qu'il y ait une autre façon de dicter l'orientation de TBP afin d'assembler un complexe pré-transcriptionnel dans la bonne polarité. Ce rôle serait exercé par les FGT TFIIB et TFIIA (Imbalzano *et al.*, 1994; Littlefield *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 1997).

La liaison de TBP à l'ADN est une étape limitante de la transcription pour plusieurs raisons. Tout d'abord, TBP peut s'oligomériser en solution, ce qui l'empêche de lier la boîte TATA

(Daugherty *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 1995). De plus, la reconnaissance de la boîte TATA et sa liaison dans la bonne orientation fait intervenir plusieurs paramètres complexifiant la liaison de TBP à l'ADN. L'obtention d'un complexe TBP-ADN stable est souvent signe d'une bonne activité transcriptionnelle (Hoopes *et al.*, 1992).

1.2.3 TFIIB

TFIIB reconnaît le complexe TBP-ADN et s'y lie par des interactions protéine-protéine ainsi que par des interactions protéine-ADN (Nikolov *et al.*, 1995). TFIIB, humain, est une petite protéine de 316 acides aminés (33 kDa) composée de domaines N-terminal et C-terminal fonctionnellement distincts. TFIIB joue différents rôles dans l'initiation de la transcription soit en stabilisant le complexe TBP-ADN, soit dans la sélection du site d'initiation de la transcription (Imbalzano *et al.*, 1994; Hawkes et Roberts 1999; Sun *et al.*, 1996).

Le domaine C-terminal de TFIIB est formé de deux répétitions directes et imparfaites qui résistent aux protéases. Il est suffisant pour former le complexe TFIIB-TBP-ADN et interagit avec la boucle (*stirup*) du domaine C-terminal de TBP (Hisatake *et al.*, 1993; Nikolov *et al.*, 1995). Il est à noter que TFIIB est en mesure de lier TBP uniquement lorsque TBP est lié à l'ADN (Malik *et al.*, 1993). Des études de photo-pontage protéines-ADN (Coulombe *et al.*, 1992; Lagrange *et al.*, 1996) ont localisé TFIIB en amont et en aval de la boîte TATA. De plus, Nikolov et collaborateurs (1995), en cristallographiant le sous-complexe TFIIB-TBP-ADN, ont déterminé que le domaine C-terminal de TFIIB lie à la fois l'ADN en amont et en aval de la boîte TATA supportant les résultats de photo-pontage. La liaison de TFIIB en aval de la boîte TATA a lieu uniquement lorsque que TBP est lié à l'ADN. La courbure induite par la liaison de TBP permet ce contact (Lagrange *et al.*, 1998).

Le domaine N-terminal de TFIIB est hautement conservé et contient un motif ruban de zinc. Il est de plus sensible aux protéases (Barbaris *et al.*, 1993; Malik *et al.*, 1993). Malgré le fait que le domaine N-terminal de TFIIB ne soit pas nécessaire pour sa liaison au complexe

TBP-ADN, celui-ci est important pour la liaison avec l'ARN pol II et la sous-unité RAP30 de TFIIF (Ha *et al.*, 1993). La capacité de TFIIB à lier à la fois les complexes TBP-ADN et ARN pol II-TFIIF le rend essentiel à la formation du complexe prétranscriptionnel et lui confère le rôle de pont moléculaire.

TFIIB est impliqué dans la stabilité du complexe TBP-ADN de deux façons. D'une part, lorsque TFIIB se lie au complexe TBP-ADN, sa liaison se trouve renforcée par la présence de l'élément BRE situé immédiatement en amont de la boîte TATA, stimulant ainsi la transcription basale (Lagrange *et al.*, 1998; Littlefield *et al.*, 1999). Parmi les gènes qui ont une boîte TATA, 46% possèdent aussi l'élément BRE avec une séquence homologue de 4-5 nucléotides sur 7. Quant aux gènes n'ayant pas de boîte TATA, la présence de l'élément BRE est beaucoup plus marquée, atteignant 77% et dont l'homologie de séquence est plus élevée (6-7 nucléotides). D'autre part, Imbalzano et collaborateurs (1994) ont démontré que TFIIB augmente l'affinité de TBP à l'ADN. En assurant la stabilité du complexe TBP-ADN, TFIIB augmente l'activité transcriptionnelle du promoteur. En effet, la durée de vie du complexe TBP-ADN est corrélée à l'activité transcriptionnelle du promoteur (Hoopes *et al.*, 1998).

TFIIB joue un rôle très important dans la sélection du site d'initiation. Cette sélection est assurée par le domaine N-terminal. En effet, la présence de mutation dans la région N-terminale de TFIIB, plus particulièrement dans le "hinge" domaine, crée un nouveau site d'initiation situé en aval du site d'initiation original (Pinto *et al.*, 1994). De plus, il a été démontré chez la levure que la sélection du site d'initiation par TFIIB se fait conjointement avec l'ARN pol II. En effet, dans un système reconstitué ne contenant que des facteurs de *Saccharomyces cerevisiae*, à l'exception de l'ARN pol II et TFIIB qui sont de *Schizosaccharomyces pombe*, il y a apparition d'un site d'initiation caractéristique à celui de *S. pombe*. L'interaction de TFIIB avec l'ARN pol II se fait probablement via Rpb1 et Rpb9, deux sous-unités ayant un rôle dans la sélection du site +1 (Li *et al.*, 1994; Furter-Graves *et al.*, 1994). Chez la levure, TFIIB est codé par le gène SUA7, un gène essentiel. Le mutant sua7-1 confère à la fois une défectuosité de croissance aux basses températures ainsi qu'un

déplacement (en aval) du site d'initiation de la transcription. Ces deux comportements peuvent être supprimés par la protéine mutante *ssu73-1* (Rpb9). Ces résultats établissent une interaction fonctionnelle entre TFIIB (*sua7*) et Rpb9 (*ssu73*) dans la sélection du site d'initiation (Sun *et al.*, 1996).

TFIIB est impliqué dans la régulation de la transcription par des interactions directes avec certains activateurs tels que GAL4-VP16, CTF-1 et GAL4-AH. La présence de ces activateurs stimulerait la transcription soit en recrutant TFIIB ou en stabilisant sa liaison à l'ADN (Lin et Green 1991). Il est connu que TFIIB possède une liaison intramoléculaire entre le domaine N-terminal et le domaine C-terminal (Fig. 6). L'activateur GAL4-VP16 modifie cette conformation, ce qui permettrait éventuellement à TFIIB d'être recruté au promoteur et de stabiliser le complexe TBP-ADN. Cette conformation ouverte (intra-ligation absente) libérerait par le fait même les sites de liaison pour l'ARN pol II et TFIIF (Lin *et al.*, 1991). Or, Bangur et collaborateurs (1999) ont démontré que la conformation fermée de TFIIB (intra-ligation présente) stabilise plus efficacement le sous-complexe TBP-ADN que la forme ouverte.

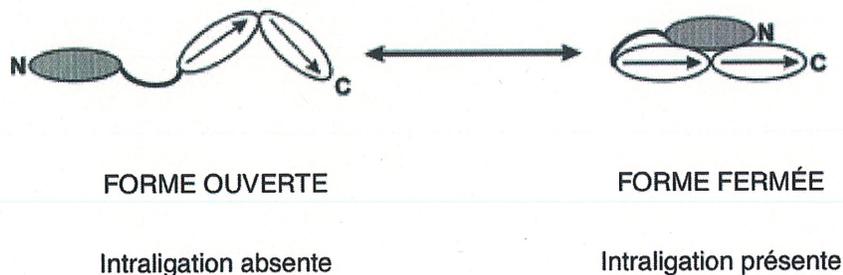


Figure 6. Schématisation de l'intra-ligation présente dans le facteur général de transcription TFIIB. Le domaine C-terminal est représenté par la lettre C et le domaine N-terminal par la lettre N (Bangur *et al.*, 1999)

1.2.4 TFIIA

Le facteur général de transcription TFIIA est non essentiel à la transcription basale de plusieurs promoteurs *in vitro*. Sa présence peut, selon les promoteurs, stimuler la transcription basale et supporter l'activation de la transcription (Liu *et al.*, 1999).

Chez l'humain, TFIIA est composé de trois sous-unités: α (33 kDa), β (19 kDa) et γ (13 kDa). Cependant, les sous-unités α et β sont codées par un seul gène. Il n'est pas encore connu s'il s'agit d'un clivage post-traductionnel ou d'un clivage artificiel suite à la purification. Chez la levure, deux sous-unités, Toa1 et Toa2, ont été identifiées. L'homologie de séquence entre les régions N-terminale et C-terminale de Toa1 et les sous-unités α et β humaines, respectivement, favorise l'hypothèse du clivage post-traductionnel d'un précurseur α - β (Orphanides *et al.*, 1996).

TFIIA peut faire parti intégrante du complexe de préinitiation et son entrée dans le complexe se fait à n'importe quelle étape de sa formation. (Cortes *et al.*, 1992). Des études de microscopie électronique et de traitement d'images ont montré que dans le complexe TFIIA-TFIIB-TFIID-ADN, TFIIA et TFIIB se situent de part et d'autre de TFIID et TBP se retrouve au centre (Andel III *et al.*, 1999).

La stimulation de la transcription par TFIIA requiert la présence de TFIID. Imbalzano et collaborateurs (1994) ont démontré que, dans des conditions suboptimales pour la liaison de TBP à l'ADN, TFIIA augmente l'affinité de TBP au promoteur et stabilise le complexe TBP-ADN. D'autre part, l'augmentation de l'affinité de TFIID pour le promoteur serait due à un changement de conformation de celui-ci induit par TFIIA. Ce changement conformationnel favoriserait des contacts additionnels entre TFIID et le promoteur (Lieberman et Berk 1994; Oelgeschalger *et al.*, 1996). TFIIA est en mesure de lier l'ADN en amont de la boîte TATA, ce qui contribue à sa capacité de stabiliser le complexe TBP-ADN

(Geiger *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1996). La stimulation de la transcription par TFIIA pourrait donc être reliée à la stabilité du complexe TBP-ADN (Hoopes *et al.*, 1992).

La stimulation de la transcription par TFIIA pourrait aussi être régulée par sa phosphorylation. Récemment, des études ont démontré que TFIIA est phosphorylé *in vivo* chez la levure (Solow *et al.*, 1999). En utilisant des TFIIA mutés au niveau des résidus phosphorylables de Toa1, l'efficacité de liaison de TFIIA à TBP est grandement diminuée *in vitro* ainsi que le niveau de transcription chez plusieurs gènes inductibles. La phosphorylation de TFIIA contribuerait à une meilleure interaction avec TBP ou l'ADN. Celle-ci pourrait aussi induire un changement conformationnel augmentant la stabilité du complexe TFIIA-TBP-ADN. En effet, le complexe TBP-ADN est 30 fois plus stable lorsque TFIIA est phosphorylé. La phosphorylation de TFIIA serait importante pour la liaison au domaine N-terminal de TBP (Solow *et al.*, 1999)

La capacité de TFIIA à contrecarrer l'action des répresseurs spécifiques à TBP est un autre moyen de stimuler la transcription. TFIIA agit alors comme anti-répresseur. Par exemple, chez la levure, le répresseur MOT1 se lie à TBP et provoque sa dissociation de son site de liaison, empêchant la formation d'un complexe de préinitiation. TFIIA, en liant TBP, empêche l'action de MOT1 (Auble et Hahn 1993). NC2 est un autre répresseur qui se lie à TBP et inhibe la formation du complexe de préinitiation en prévenant l'assemblage des autres facteurs tels que TFIIB. TFIIA est en mesure de compétitionner NC2, rendant son action inhibitrice moins efficace (Orphanides *et al.*, 1996; Lee et Young 1998).

Le facteur de transcription TFIIA joue un rôle important comme médiateur dans l'activation de la transcription et sert de cible pour moduler la transcription des gènes de classe II. En effet, dans un système reconstitué, TFIIA est en mesure de supporter l'activation de la transcription par l'intermédiaire d'activateurs (Sp1, VP16, NTF-1 et Zta), mais seulement en présence de TFIID et non de TBP. Cependant, une étroite interaction entre TBP et TFIIA est nécessaire pour l'activation de la transcription *in vivo* (Stargell et Struhl 1995). Une

façon par laquelle TFIIA peut exercer son rôle de co-activateur est d'accélérer la vitesse de dissociation de dimère TBP-TBP ou TFIID-TFIID. Cette dissociation est un processus lent pouvant être considéré comme une étape limitante de la transcription (Coleman *et al.*, 1995).

1.2.5 TFIIF

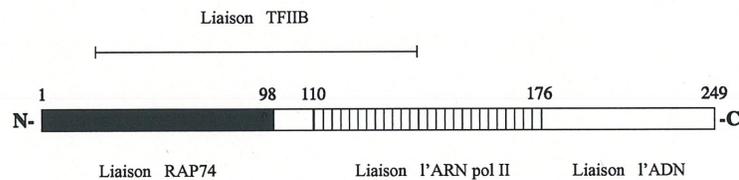
Le facteur général TFIIF est impliqué dans le recrutement de l'ARN pol II au promoteur. TFIIF est particulier en ce sens qu'il est requis à toutes les étapes de la transcription, c'est-à-dire dans la formation du complexe de préinitiation, dans la sélection du site d'initiation, pendant le dégagement du promoteur par l'ARN pol II, et dans l'élongation de la transcription (Tan *et al.*, 1994; Fang et Burton 1996; Dvir *et al.*, 2001).

TFIIF est un hétérotétramère de la forme $\alpha_2\beta_2$ composé des sous-unités RAP30 (*RNA polymerase II-associated protein of 30kDa*) et de RAP74 (58 kDa). La différence entre les poids moléculaires prévus et observé en SDS-PAGE est due à la phosphorylation des deux sous-unités de TFIIF *in vivo*, ce qui crée une migration atypique des sous-unités RAP30 et, surtout, RAP74 (Flores *et al.*, 1989; Burton *et al.*, 1988). RAP30 et RAP74 jouent des rôles distincts et fonctionnellement séparables au cours de la transcription.

La sous-unité RAP30, humain, comprend 249 acides aminés et possède trois régions fonctionnelles (Fig. 7a). La région N-terminale (a.a. 1-110) est en mesure de lier la sous-unité RAP74 et TFIIB (a.a. 1-176). Puisque les deux sites de liaison se chevauchent, la liaison de RAP74 à RAP30 inhibe la liaison de RAP30 à TFIIB. La région centrale est impliquée dans la liaison de l'ARN pol II. Quant au domaine C-terminal, il est capable de lier l'ADN non-spécifiquement et est important pour une transcription initiée correctement au site +1 (Fang et Burton 1996).

RAP74, humain, comprend 517 acides aminés et peut être divisé en deux régions principales (Fig.7b). Le domaine N-terminal (a.a. 1-217) supporte la majorité des fonctions de RAP74 dans l'assemblage du complexe de préinitiation, dans l'initiation au site +1 et durant l'élongation. Il est requis pour la liaison de RAP30 (a.a. 1-172) et possède un domaine de dimérisation avec RAP74, nommé HIR1 (*Homomeric interaction domain*), essentiel pour son activité en transcription (Robert *et al.*, 1998). Le domaine C-terminal, quant à lui, contacte l'ARN pol II et TFIIB (a.a. 358-517). Il possède aussi une activité stimulatrice pour la CTD phosphatase, ce qui l'implique dans le recyclage de l'ARN pol II (Fig. 7b) (Fang et Burton 1996; Lei *et al.*, 1998). La région centrale entre les acides aminés 207-356 masque la région C-terminale au niveau des sites de liaison de l'ARN pol II et TFIIB, et inhibe l'activité stimulatrice de la CTD phosphatase.

A)RAP30



A)RAP74

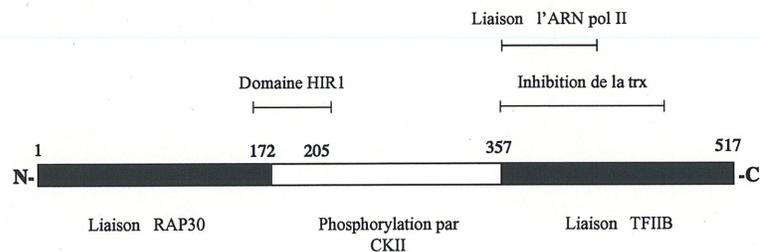


Figure 7. Schématisation des domaines et fonctions des sous-unités A) RAP30 et B) RAP74 de TFIIF

Un hétérodimère comportant les domaines N-terminaux de RAP30 (a.a. 2-119) et RAP74 (a.a. 2-172) a récemment été cristallographié (Fig. 8) (Gaiser *et al.*, 2000). La dimérisation requiert conjointement un repliement des domaines N-terminaux prenant la forme de deux cylindres formés de plusieurs feuillets β entrelassés (cylindre-feuillet- β). L'interface des deux domaines adopte aussi la forme cylindre-feuillet- β , d'où le nom de triple cylindre- β . À chaque extrémité des cylindres de RAP30 et RAP74 sortent deux boucles pouvant être impliquées dans des interactions avec les autres composantes de la machinerie transcriptionnelle. De plus, la surface engendrée par ce triple-cylindre- β est relativement grande pour une simple interaction protéine-protéine.

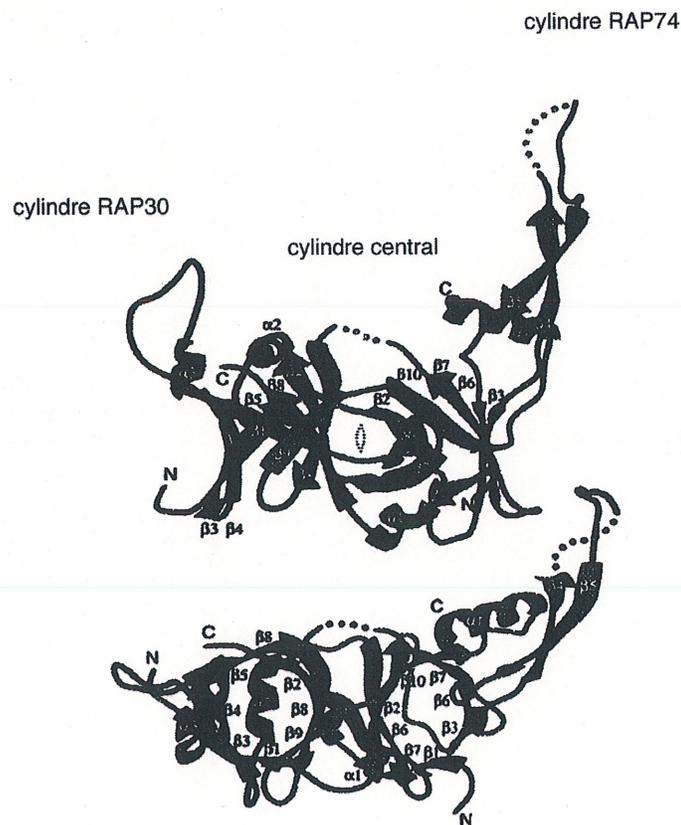


Figure 8. Structure du dimère RAP30 (2-119)-RAP74 (2-172) formant un triple cylindre- β (Gaiser *et al.*, 2000)

TFIIF est impliqué dans la formation du complexe prétranscriptionnel par sa capacité de lier l'ARN pol II. RAP30 est reconnu pour être suffisant au recrutement de l'ARN pol II au promoteur. La présence de RAP74 augmente la capacité de RAP30 à recruter l'ARN pol II et augmente la stabilité du complexe TBP-TFIIA-TFIIB-TFIIF-ARN pol II-ADN. La stabilisation assurée par la présence de RAP74 est due aux nombreuses interactions avec les autres composantes du complexe comme TFIIB, TAF_{II}250 et TFIIE (Ha *et al.*, 1993; Maxon *et al.*, 1994; Ruppert et Tjian 1995; Dickstein *et al.*, 1996).

La présence de TFIIF dans le complexe prétranscriptionnel induit une réorganisation de celui-ci. En effet, des études de photo-pontage protéines-ADN ont démontré que l'ARN pol II, en absence de RAP74, est localisée entre les positions -19 et -1, tandis qu'en présence de RAP74, l'ARN pol II est localisée entre les positions -40 et +13 (Forget *et al.*, 1997; Robert *et al.*, 1998). Un autre fait intéressant est que RAP74 se situe entre les positions -60 et +30. Dans les deux cas, la longueur de l'empreinte de RAP74 et de l'ARN pol II, en présence de RAP74, est supérieure à leur plus grande dimension. Conjointement avec les études de microscopie électronique suggérant que le complexe prétranscriptionnel engouffre environ 51 pb et les résultats de photo-pontage, Coulombe et collaborateurs (1997; 1998) ont développé un modèle où TFIIF provoque l'enroulement de l'ADN du promoteur autour de l'ARN pol II (Fig. 9). Afin que TFIIF puisse induire cet enroulement, il doit entrer sous forme d'hétérotétramère dans le complexe. Le domaine HIR1 (a.a. 172-205) de RAP74 est responsable de cette homomérisation (Robert *et al.*, 1998).

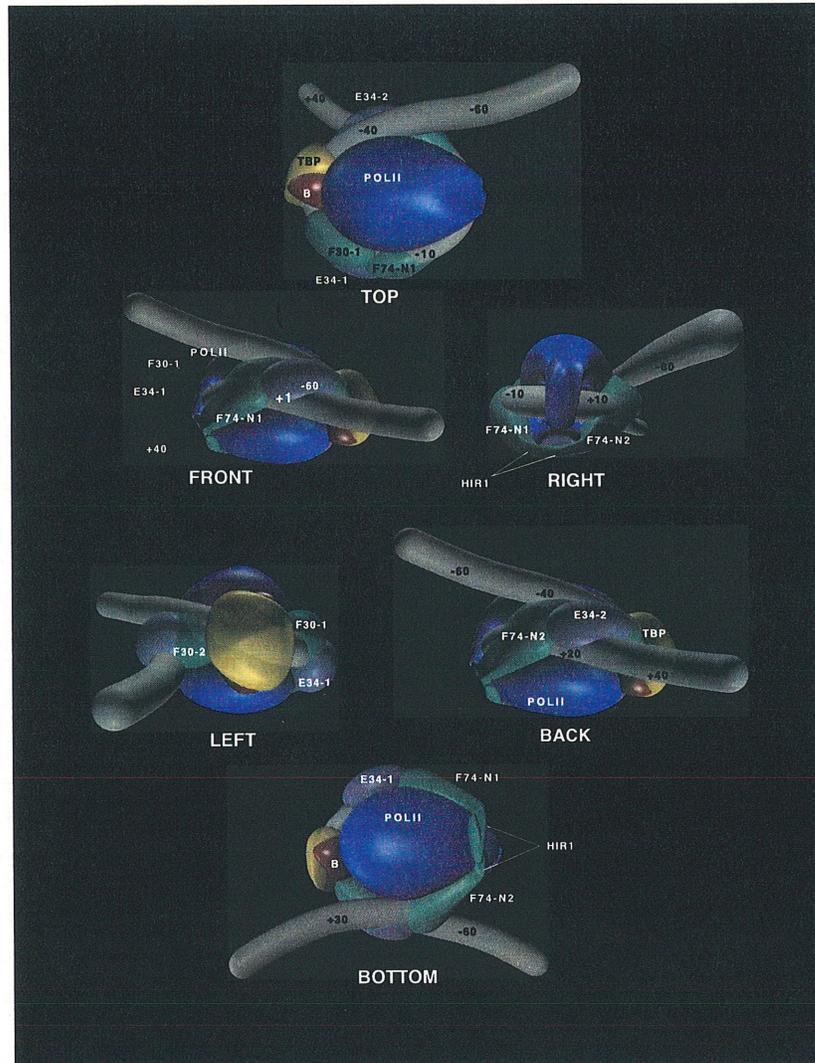


Figure 9. Modèle d'enroulement induit par la présence de TFIIF (Robert *et al.* 1998)

L'initiation de la transcription est facilitée par l'action de TFIIF. La sous-unité RAP30 est en mesure d'empêcher la liaison non-spécifique de l'ARN pol II à l'ADN. Par contre, ensemble, les sous-unités RAP30 et RAP74 sont capables de déloger l'ARN pol II déjà liée non-spécifiquement à l'ADN (Killeen *et al.*, 1992).

La présence de TFIIF dans le complexe prétranscriptionnel aide l'ouverture de l'hélice d'ADN au niveau du site d'initiation. Ceci pourrait être dû à l'enroulement de l'ADN du promoteur autour de l'ARN pol II (Coulombe et Burton 1999). En effet, lors de l'enroulement, des tensions sont emmagasinées dans l'ADN, ce qui causeraient une légère ouverture des brins d'ADN. De plus, la présence de TFIIF est nécessaire pour certains promoteurs afin d'initier la transcription efficacement. Cependant, des études de transcription *in vitro* ont démontré que lorsque les promoteurs ont la région d'initiation pré-ouverte, TFIIF n'est pas essentiel pour la transcription (Pan et Greenblatt 1994).

Une particularité de TFIIF est d'agir à la fois sur l'initiation et l'élongation de la transcription. Tout d'abord, TFIIF aide l'ARN pol II à se dégager du promoteur en participant à la synthèse du premier lien phosphodiester (Tan *et al.*, 1994). Aussi, TFIIF, par sa présence dans le complexe d'élongation, est en mesure de stimuler la processivité de l'ARN pol II aidant l'ARN pol II à surpasser les site de pause de la même façon que le facteur d'élongation SIII (Bradsher *et al.*, 1993, voir section 2.3). TFIIF diminue ainsi la fréquence d'ARNm abortifs. L'interaction de TFIIF avec TFIIE et TFIIH l'impliquerait d'une autre façon dans le dégagement du promoteur dépendente à TFIIH. Les fonctions de TFIIF dans le dégagement du promoteur sont médiées par deux régions fonctionnelles différentes (Dvir *et al.*, 1997a; Yan *et al.*, 1999).

Selon Dvir et collaborateurs (2000), TFIIF pourrait être un obstacle au dégagement du promoteur. D'une part, lorsqu'il induit l'enroulement de l'ADN, il se trouve à contacter l'ADN en aval du site +1. Cette interaction nuirait à l'élongation précoce de l'ARN pol II. L'action de l'hélicase XPB de TFIIH en présence d'ATP hydrolysable permettrait de

renverser cette inhibition en élargissant l'ouverture du promoteur, brisant l'interaction TFIIF-ADNdb.

Plusieurs études ont démontré que l'activité de TFIIF peut être régulée soit par une acétylation ou une phosphorylation de RAP74. L'acétylation est assurée par les histones acétylases p300/CPB ou PCAF, tandis que la phosphorylation est médiée par la caséine kinase II (CKII) (Rossignol *et al.*, 1999; Kitajima *et al.*, 1994). Il est à noter que TAF_{II}250 a la capacité d'acétyler et de phosphoryler RAP74. Cette phosphorylation de TFIIF augmente son affinité pour l'ARN pol II, pouvant mener à l'accélération de la formation du complexe de préinitiation (Kitajima *et al.*, 1994). TFIIF possède aussi une activité kinase lui permettant de s'autophosphoryler sur des résidus différents des sites d'acétylation et de phosphorylation par CKII (Rossignol *et al.*, 1999). L'autophosphorylation de RAP74, contrairement à la phosphorylation par CDKII, inhibe sa capacité d'augmenter la processivité de l'ARN pol II. La phosphorylation de RAP74 se fait dans sa région centrale.

Dans le complexe d'initiation, l'activité stimulatrice de RAP74 pour la CTD phosphatase est inhibée par la liaison de TFIIB à RAP74. Cette inhibition serait maintenue un certain temps dans le complexe d'élongation, suggérant que TFIIB fait aussi parti du complexe d'élongation (Lei *et al.*, 1998). Le relargage de TFIIB au cours de l'élongation enclencherait l'activité CTD phosphatase et l'ARN pol II passerait de la forme IIO à la forme IIA.

1.2.6 TFIIE

La complétion de l'assemblage du complexe prétranscriptionnel se fait par l'arrivée de TFIIE suivie de celle de TFIIH. TFIIE entre dans le complexe sous forme d'hétérotétramère médié par la dimérisation possible entre la sous-unité E56 (E34-E56-E56-E34) (Okhuma *et al.*, 1990; Peterson *et al.*, 1991). TFIIE est un facteur conservé au cours de l'évolution de la levure (facteur a) à l'humain (TFIIE). L'entrée de TFIIE dans le complexe

prétranscriptionnel dépend du domaine N-terminal de E56 (Kuldell et Buratowski 1997). Plusieurs rôles ont été définis pour TFIIE soit dans la formation du complexe de préinitiation, dans l'ouverture de la bulle de transcription et dans le dégagement du promoteur par l'ARN pol II. De plus, TFIIE influence directement les activités enzymatiques de TFIIH soit les activités kinase, hélicase ADN-dépendante et ATPase (Ohkuma et Roeder 1994; Ohkuma *et al.*, 1995).

Le premier rôle attribué à TFIIE est le recrutement de TFIIH au sein du complexe de préinitiation. Le recrutement de TFIIH, via la sous-unité XPB, dépend des domaines C-terminaux de E56 et de E34 (Yokomori *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 1998). Des études de photo-pontage protéine-ADN (Robert *et al.*, 1996) ont localisé la sous-unité E34, et non E56, dans la région du site d'initiation de la transcription entre les positions -14 et -2. De plus, TFIIE, via la sous-unité E34, établit de nombreux contacts avec des composantes de la machinerie transcriptionnelle comme TFIIB, RAP30 et l'ARN pol IIA près de son site catalytique, appuyant sa position dans la région du site d'initiation (Leuther *et al.*, 1996; Pan et Greenblatt 1994; Okamoto *et al.*, 1998). Selon Maxon et collaborateurs (1994), TFIIE dirigerait TFIIH vers le CTD de l'ARN pol II. La position de TFIIE dans le complexe pourrait favoriser le positionnement de TFIIH.

Lors de l'enroulement du promoteur, il est probable qu'une pré-ouverture de l'ADN soit générée au niveau du site d'initiation. La présence d'ADN simple brin (ADNsb) peut causer une instabilité du complexe prétranscriptionnel. Or, TFIIE est en mesure de stabiliser en formant des interactions protéines-protéines avec les composantes de la machinerie transcriptionnelle et en liant la jonction de l'ADNdb-ADNsb (Maxon *et al.*, 1994; Kudell et Buratowski 1997; Okuda *et al.*, 2000). En effet, la sous-unité E34, via son domaine C-terminal, est en mesure de lier l'ADNsb, tandis la liaison à l'ADNdb dépend des deux sous-unités à la fois (Kuldell et Buratowski 1997).

En maintenant la pré-ouverture du promoteur, TFIIE participe indirectement à l'ouverture du promoteur en fournissant aux hélicases de TFIIH un substrat ADNsb leur permettant d'ouvrir davantage le promoteur. De plus, TFIIE est en mesure de stimuler l'activité hélicase ADN-dépendent et ATPase de TFIIH (Ohkuma et Roeder 1994; Serizawa *et al.*, 1994). Tijerina et Sayre (1998), ainsi que Holstege et collaborateurs (1995) ont démontré que pour certains promoteurs, et dans le cas où le promoteur est pré-ouvert au niveau de l'initiateur, TFIIE et TFIIH n'étaient pas requis pour la transcription, renforçant l'idée qu'ils jouent un rôle dans l'ouverture du promoteur.

TFIIE est aussi relié au dégagement du promoteur. Dans certaines conditions, Dvir et collaborateurs (1996, 1997) ont observé que la présence de TFIIE, TFIIH et d'ATP hydrolysable permettait à l'ARN pol II de surpasser les sites de pause proximaux diminuant ainsi la fréquence d'ARNm abortifs. Ceci peut être dû à deux phénomènes. Premièrement, TFIIE, en stimulant l'activité hélicase et ATPase de TFIIH, permet l'expansion de l'ouverture du promoteur. Deuxièmement, TFIIE stimule l'activité kinase de cdk7, favorisant ainsi la phosphorylation du CTD de l'ARN pol II (Ohkuma et Roeder 1994; Serizawa *et al.*, 1994).

Un autre rôle attribué à TFIIE est sa capacité de recruter TBP ou TFIID en absence des autres facteurs généraux de transcription, via le domaine N-terminal de E56. La sous-unité E34 aide la liaison de TFIIE à TBP ou TFIID en se liant non -spécifiquement à l'ADN et à TFIIA (Yokomori *et al.*, 1998).

1.2.7 TFIIH

TFIIH est un complexe multiprotéique composé de neuf sous-unités dont XPB/p89, XPD/p80, p62, p52, p44, p32, la kinase cdk7, la cycline H et MAT1. Six de ces sous-unités (XPB/p89, XPD/p80, p62, p52, p44, p32) forment le "core" de TFIIH, alors que les trois

autres sous-unités (la kinase cdk7, la cycline H et MAT1) forment un sous-complexe nommé CAK (*CDK-activating kinase*) pouvant être associé ou non avec le "core" de TFIIH.

Récemment, l'architecture moléculaire de TFIIH a été déterminée par microscopie électronique à une résolution de 3,8 nm. TFIIH prend l'allure d'un anneau avec une protubérance dont la dimension totale est de 16x12,5x7,5 nm (Fig. 10) (Schultz *et al.*, 2000). Par des marquages faits à l'aide d'anticorps, certaines sous-unités de TFIIH ont été localisées dans cette structure. La protubérance contient la kinase cdk7, ce qui suggère qu'elle pourrait représenter le sous-complexe CAK (cdk7, cyclin H et MAT1). Quant à l'anneau proprement dit, la sous-unité p44 a été localisée à l'interface entre la protubérance et l'anneau. De part et d'autre de p44 se trouvent les hélicases XPB et XPD. La localisation des autres sous-unités reste à définir. XPD est en mesure de lier à la fois MAT1 du complexe CAK et p44 de TFIIH, lui conférant le rôle de charnière entre les deux complexes. Ceci peut être appuyé par le fait que XPD peut se retrouver soit dans le "core" de TFIIH ou dans le sous-complexe CAK (Feaver *et al.*, 1994; Rossignol *et al.*, 1997).

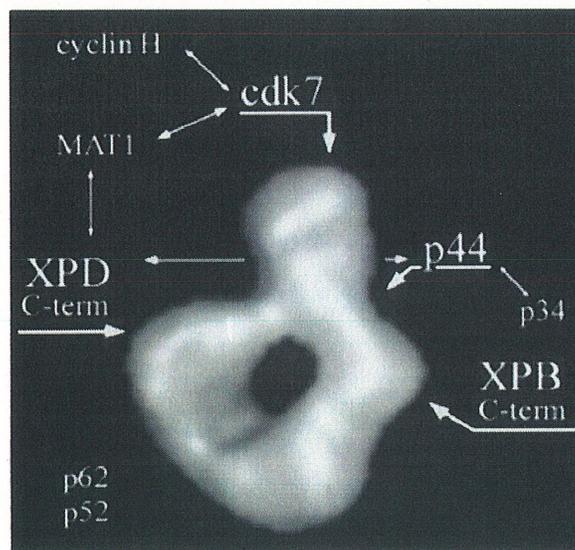


Figure 10. Structure du facteur général de transcription TFIIH montrant la localisation des sous-unités et leurs interactions (Schultz *et al.*, 2000)

À la différence des autres facteurs généraux de transcription, TFIIH possède à la fois des activités enzymatiques ATPase, hélicases ADN-dépendentes et kinase (Feaver *et al.*, 1991 1993; Lu *et al.*, 1992; Schaeffer *et al.*, 1993, 1994). Les hélicases XPB/p89 et XPD/p80 possèdent respectivement une activité 3'-5' et 5'-3' dépendante de l'hydrolyse d'ATP. Ces activités enzymatiques procurent à TFIIH plusieurs fonctions importantes dans l'initiation de la transcription, particulièrement dans l'ouverture et dans le dégagement du promoteur par l'ARN pol II.

L'entrée de TFIIH dans le complexe prétranscriptionnel apporte une réorganisation des composantes de la machinerie de transcription. Ceci est démontré par des études de photo-pontage protéines-ADN en présence ou non de TFIIH (Douziech *et al.*, 2000). La présence de TFIIH dans le complexe de préinitiation modifie la localisation de certaines sous-unités. Par exemple, la sous-unité TFIIE56 n'est pas photo-pontée en absence de TFIIH, tandis qu'en présence de TFIIH, celle-ci est localisée à plusieurs positions telles qu'à -45/-48, -39/-40, -5 et +13. RAP30, TFIIE34 et les deux plus grosses sous-unités de l'ARN pol II, Rpb1 et Rpb2 ont également été localisées à des nouvelles positions sur le promoteur en présence de TFIIH. L'hélicase XPB/p89 a été localisée à différents endroits sur le promoteur entre les positions -45 et +35, dont entre autres à la position -5 au cœur de la région qui sera ouverte en présence d'ATP. Il en est de même pour l'hélicase XPD/p80. Ces résultats supportent l'idée que TFIIH resserre l'enroulement de l'ADN autour de l'ARN pol II. De plus, la région centrale (a.a. 51-277) de TFIIE34 est non seulement essentielle pour l'initiation de la transcription *in vitro*, mais aussi pour bien positionner TFIIH et permettre le resserrement de l'ADN autour de l'ARN pol II.

Un rôle important de TFIIH dans l'initiation de la transcription est l'ouverture du promoteur entre les positions -9 et +2. Cette ouverture permet à l'ARN pol II de faire contact avec le brin-matrice afin d'initier la transcription. L'ouverture du promoteur est médiée essentiellement par l'hélicase XPB/p89. L'hélicase XPD/p80 n'est pas essentielle quoique sa présence stimule l'activité de XPB/p89 (Tirode *et al.*, 1999; Moreland *et al.*, 1999;

Bradsher *et al.*, 2000). Dans les expériences de Douziech et collaborateurs (2000), le signal de l'hélicase XPB/p89 est plus fort que celui de l'hélicase XPD/p80, ce qui est consistant avec le fait que XPB/p89 soit essentiel à l'ouverture du promoteur et non XPD/p80 (Douziech *et al.*, 2000). Ceci est particulièrement vrai pour le contact à la position -5 dans la région d'ouverture du promoteur.

Douziech et collaborateurs (2000) ont proposé un modèle définissant le mécanisme d'ouverture du promoteur par l'hélicase XPB/p89 (Fig. 11). Par analogie à l'hélicase procaryote PrcA, XPB/p89, en absence d'ATP, lierait l'ADNsb créé par l'enroulement serré de l'ADN autour de l'ARN pol II à la position -5. Lorsque l'ATP se lie sur XPB/p89, ce dernier subirait un changement conformationnel accentuant la séparation des brins d'ADN catalysant ainsi la forme ouverte du complexe. L'ouverture du promoteur en présence d'ATP apporte deux nouveaux contacts des composantes de la machinerie transcriptionnelle avec l'ADN: Rpb1 localisé à la position -5 et Rpb2 localisé à la position +1. Ces résultats indiquent que l'ouverture du promoteur entre -9 et +2 positionne l'ADN dans le site catalytique de l'ARN pol II.

Reinberg et collaborateurs (2000) ont aussi étudié l'organisation du complexe prétranscriptionnel en utilisant la technique de photo-pontage protéine-ADN. Dans ce cas, les complexes ont été préalablement lavés avec le détergent sarkosyl. Selon ces auteurs, le traitement au sarkosyl permettrait d'éliminer les complexes non-spécifiques et non-productifs. Les résultats obtenus indiquent que l'arrivée de TFIIE et de TFIIH dans le complexe prétranscriptionnel n'altère pas son organisation et que TFIIH est localisé uniquement en aval du site d'initiation (+3 à +25).

De plus, les résultats de Reinberg et collaborateurs (2000) indiquent qu'en présence d'ATP, l'organisation du complexe prétranscriptionnel n'est pas modifiée en amont de l'ouverture du promoteur. Des nouveaux contacts sont cependant induits pour Rpb2 à la position -2, TFIIE entre les positions -10 et +10 ainsi que pour l'hélicase XPB de TFIIH entre les

positions +1 et +25. À la lumière de ces résultats, l'hélicase XPB n'utiliserait pas le même mécanisme qu'une hélicase conventionnelle. Le modèle proposé pour l'ouverture du promoteur est que XPB, situé en aval du site d'ouverture, déroulerait l'ADN en prenant comme point d'appui le complexe prétranscriptionnel, menant à l'ouverture du promoteur. XPB agirait comme une clé à molette.

TFIIH joue aussi un rôle dans le dégagement de l'ARN pol II du promoteur. Dans un premier temps, TFIIE et TFIIH en présence d'ATP, sont en mesure de prévenir un arrêt prématuré de l'ARN pol II entre les positions +10 et +14 juste avant la transition entre l'élongation précoce et l'élongation productive (Dvir *et al.*, 1996; 1997a; Dvir *et al.*, 1997b). L'hélicase XPB est probablement responsable de ce phénomène, alors que XPD jouerait un rôle plutôt structural qu'enzymatique (Moreland *et al.*, 1999; Bradsher *et al.*, 2000). TFIIE stabilise la liaison de TFIIH à l'ARN pol II au début de l'élongation (Dvir *et al.*, 1997a). La présence de CAK dans le complexe TFIIH augmente l'efficacité de l'initiation, mais d'une façon structurale et non enzymatique *in vitro* (Bradsher *et al.*, 2000). Or, TFIIH possède une activité kinase cdk7 apte à phosphoryler le CTD de l'ARN pol II (Lu *et al.*, 1992; Makela *et al.*, 1995) et essentielle pour la transcription *in vivo*. La phosphorylation du CTD par cdk7 permet le passage de l'ARN pol II en mode élongation. TFIIH est retenue dans le complexe d'élongation jusqu'au trentième nucléotide (Zawel *et al.*, 1995).

La phosphorylation du CTD par la kinase cdk7 se fait uniquement lorsque CAK est lié au "core" du promoteur via l'interaction MAT1-XPB. Lorsque CAK se retrouve dissocié du "core" de TFIIH, la spécificité de cdk7 change et ce dernier phosphoryle préférentiellement la kinase cdc2, une kinase impliquée dans le cycle cellulaire. MAT1 dicterait alors la spécificité de cdk7 (Busso *et al.*, 2000). La kinase cdk7 peut être régulée par la kinase cdk8/cycline C. Celle-ci est en mesure de phosphoryler la cycline H de cdk7 inhibant l'activité kinase de TFIIH et la capacité d'activer la transcription (Akoulitchev *et al.*, 2000). Advenant que CAK soit dissocié du "core" de TFIIH, l'activité kinase de cdc2/cycline B

sera inhibée de la même façon. Il est à noter que ce processus d'inhibition est unique chez les organismes supérieurs et n'est pas présent chez la levure.

Une particularité de TFIIH est son rôle dans la réparation de l'ADN par excision des nucléotides (NER). Lors du NER, la région endommagée est reconnue par la machinerie de réparation dont fait partie TFIIH. Par la suite, deux incisions sont faites en 5' et en 3' de la région altérée. Les résidus situés entre ces deux incisions, environ 24 à 32, seront enlevés et remplacés par une synthèse de réparation (de Laat *et al.*, 1999). La présence des hélicases XPB et XPD est essentielle pour l'action des endonucléases responsables de ces deux incisions (van Vuuren *et al.*, 1994; Winkler *et al.*, 2000). Les hélicases permettent l'ouverture de la région endommagée donnant accès aux endonucléases XPF (incision en 5') et XPG (incision en 3').

CAK peut réguler négativement la réparation de l'ADN en phosphorylant la protéine XPG. En effet, il a été remarqué que l'activité kinase de TFIIH dans les cellules de mammifères, baisse en conditions d'irradiation aux UV, suggérant que les cellules peuvent avoir un mécanisme supprimant l'activité de CAK lorsque la réparation de l'ADN est urgente (Adamczewski *et al.*, 1996).

Le double rôle de TFIIH dans la transcription et dans la réparation de l'ADN lui donne un très grande importance. La présence de mutations non-létales dans les gènes XPB et XPD donne lieu à des maladies héréditaires telles que Xeroderma pigmentosum (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et le la trichothiodystrophie (TTD). Selon la mutation, il peut survenir une défectuosité soit dans le mécanisme de la transcription, dans la réparation de l'ADN ou les deux, menant à des symptômes différents et plus ou moins sévères selon les cas.

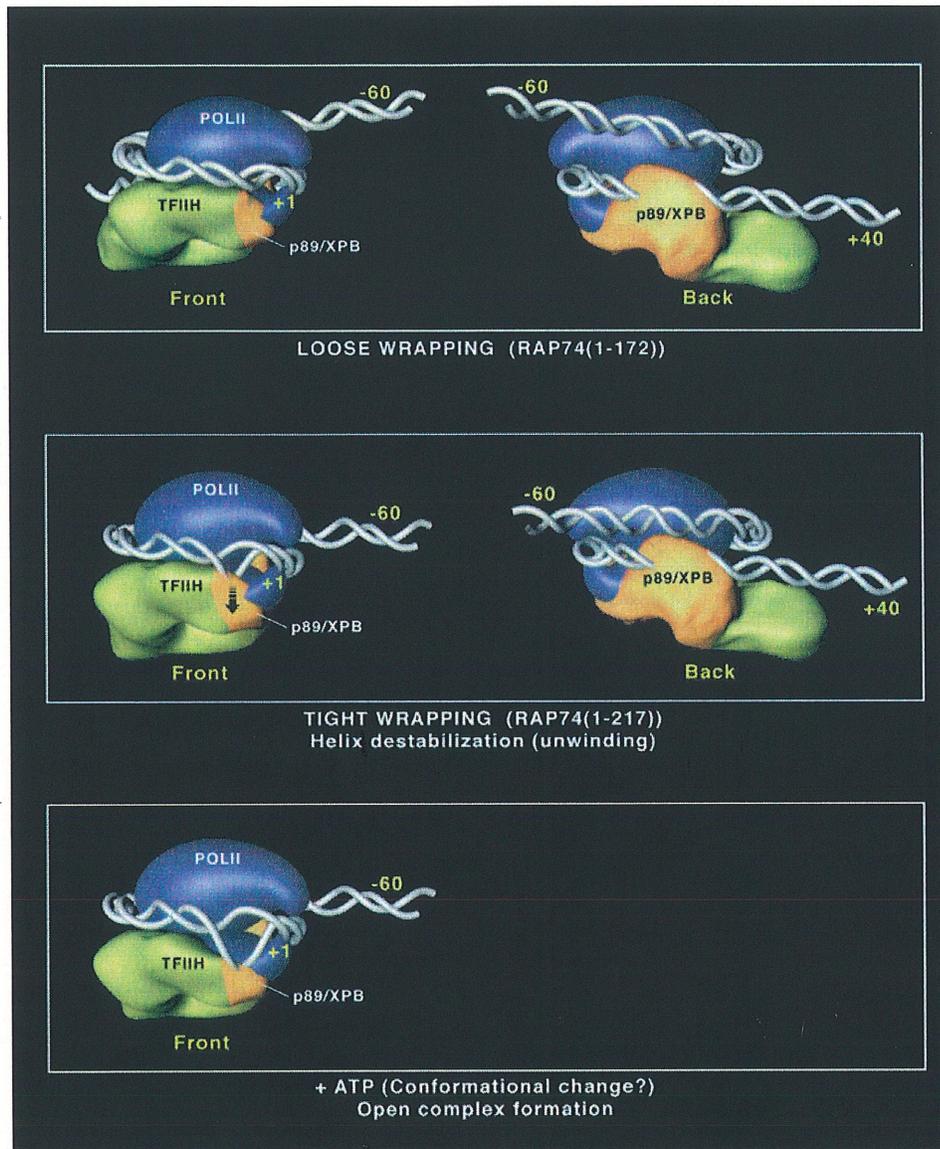


Figure 11. Modèle de l'ouverture du promoteur par l'hélicase XPB/p89 (orangé) de TFIIH (jaune) (Douziech *et al.* 2000)

1.3 Élongation de la transcription

L'élongation de la transcription consiste en l'allongement du pré-ARNm par l'ARN pol II. L'étape d'élongation peut être subdivisée en trois parties: le dégagement du promoteur, la phase précoce et la phase productive. Au cours de l'élongation, le complexe d'élongation rencontrera différents obstacles comme des sites de pause, des sites d'arrêt, des signaux de terminaison, des protéines liées à l'ADN ou des nucléosomes. Ces obstacles nuiront à la progression de la synthèse de l'ARNm. Afin de contrer ces obstacles, des facteurs d'élongation viendront en aide à l'ARN pol II (revue dans Maldonado et Reinberg 1995, Marshall *et al.*, 1996).

Lors du dégagement du promoteur, la phosphorylation du CTD de l'ARN pol II par la kinase cdk7 de TFIIF permet la transition entre l'initiation (ARN pol IIA) et l'élongation (ARN pol IIO). Cette transition mène à la synthèse des premiers liens phosphodiester. Au cours de la synthèse des 10 premiers nucléotides, et conjointement à la phosphorylation du CTD, plusieurs composantes de la machinerie transcriptionnelle se dissocient de l'ARN pol II. L'ARN pol II jumelée avec l'ARNm naissant, l'ADN et autres protéines (TFIIF, TFIIF, CTD phosphatase, etc) forment maintenant le complexe d'élongation et entrent dans la phase précoce de l'élongation (Orphanides *et al.*, 1996, Conaway *et al.*, 2000).

La phase précoce de l'élongation est propice à la synthèse d'ARNm abortifs. Dans plusieurs promoteurs, la présence d'un site d'arrêt proximal a été observée autour du 10^e ou 15^e nucléotide. Puisque l'ARNm ne couvre qu'une dizaine de nucléotides, le complexe d'élongation peut être instable, ce qui le prédispose à l'arrêt. En effet, la stabilité du complexe d'élongation est déterminée par la stabilité de l'hétéroduplex ARNm-ADN (Yager *et al.*, 1991). Comme mentionné auparavant, les facteurs TFIIF, TFIIE et TFIIF peuvent minimiser la production d'ARNm abortifs. Ceci est plus particulièrement observé pour TFIIF, un facteur qui augmente la vitesse d'élongation de l'ARN pol II durant la phase précoce, amenant plus rapidement à la stabilité du complexe d'élongation (Yan *et al.*, 1999).

La phosphorylation du CTD par la kinase cdk7 n'est pas suffisante pour permettre la transition entre l'élongation abortive et productive (Marshall *et al.*, 1996). De plus, lorsque le complexe d'élongation atteint le 30^e nucléotide, le facteur TFIIF est relargué du complexe d'élongation (Zawel *et al.*, 1995). Marshall et collaborateurs (1996) ont démontré que la kinase cdk9 (P-TEFb) peut phosphoryler le CTD de l'ARN pol II au stade précoce de l'élongation conduisant l'ARN pol II en mode d'élongation productive. La kinase cdk9 requiert que le CTD soit initialement phosphorylé par cdk7.

Afin que l'ARN pol II puisse poursuivre la transcription, la phosphorylation du CTD doit être maintenue. Or, l'ARN pol II contient un site d'attache pour la CTD phosphatase. Ce site est essentiel pour l'activité CTD phosphatase et est distinct du CTD (Chambers *et al.*, 1995). La CTD phosphatase doit donc être inhibée. Le facteur capable d'inhiber l'activité phosphatase est TFIIB. En effet TFIIB, en se liant à la sous-unité RAP74 de TFIIF, inhibe l'activité stimulatrice de RAP74 pour la CTD phosphatase. (Greenblatt 1997; Lei *et al.*, 1998).

La transcription se termine lorsque le signal de polyadénylation est transcrit et que l'ARN pol II a atteint un site de terminaison situé à quelque paires de bases en aval du signal de polyadénylation (Aranda et Proudfoot 1999). Selon le modèle proposé par Greenblatt (1997), la transcription du signal de polyadénylation provoquerait le relargage de TFIIB, supprimant l'effet d'inhibition. La déphosphorylation du CTD peut donc être initiée. L'ARN pol II passerait alors de la forme IIO à la forme IIA. Les facteurs TFIIB et TFIIF contribueraient ainsi au recyclage de l'ARN pol II.

Lorsque l'ARN pol II rencontre un site de pause ou d'arrêt, elle s'arrête et effectue un mouvement de recul sur l'ADN. Durant ce recul, il y a déplacement de l'extrémité 3' de l'ARNm du site catalytique de l'ARN pol II. Ce déplacement est spontanément réversible. À la différence des sites de pause, les sites d'arrêt ne sont pas réversibles de façon spontanée. Ceci est dû au fait que le recul de l'ARN pol II est plus important, causant un

désalignement majeur de l'extrémité 3' de l'ARNm du site catalytique de l'ARN pol II. Il n'est donc pas possible pour l'ARN pol II de poursuivre la synthèse et elle reste en état d'arrêt (revue dans Conaway *et al.*, 2000). La stabilité du complexe d'élongation est un facteur important qui détermine si l'ARN pol II est sensible aux sites de pause et d'arrêt (Landick 1999). Afin de pouvoir poursuivre la transcription une fois arrêtée sur un de ces sites, l'ARN pol II a recours à des facteurs d'élongation.

Les facteurs d'élongation forment trois classes. La première classe contient une protéine capable de réactiver l'ARN pol II en mode d'arrêt. Jusqu'à maintenant, un seul facteur, TFIIS (ou SII ou RAP38), a été identifié. L'interaction de TFIIS avec l'ARN pol II arrêtée stimule le clivage, par l'ARN pol II, d'environ 7 à 17 nucléotides de l'extrémité 3' de l'ARNm. Ce clivage crée une nouvelle extrémité 3' bien positionnée dans le site catalytique de l'ARN pol II. Il devient alors possible pour l'ARN pol II de poursuivre la transcription (revue dans Maldonado et Reinberg 1995). La deuxième classe de facteurs d'élongation contient plusieurs membres dont TFIIF, SIII (Élongine), ELL et, découverts tout récemment, CSB (*Cockayne syndrome B*), Tat-Sf1 et CA150. Ces facteurs sont en mesure de prévenir l'arrêt de l'ARN pol II sur les sites de pause en augmentant sa vitesse d'élongation de la transcription. La troisième classe permet l'élongation de la transcription en modifiant la structure de la chromatine et contient les facteurs SWI/SNF (complexe de remodelage de la chromatine), HMG14, FACT et le complexe Elongator (Dvir *et al.*, 2000).

Anciennement, il était convenu que la transcription et la maturation des ARNm étaient deux processus distincts. Or, de plus en plus d'évidences tendent à démontrer une coopération entre la transcription et la maturation des ARNm. En effet, il a été démontré que la phosphorylation du CTD permet le recrutement de plusieurs complexes protéiques dont des complexes impliqués dans la maturation et l'épissage des ARNm (Chabot *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 1997; McCracken *et al.*, 1997a, McCracken *et al.*, 1997b; Hirose *et al.*, 1999).

1.4 Régulation de la transcription

La régulation des gènes spécifie quels groupes de gènes seront exprimés, à quel niveau et dans quels tissus. La régulation de la transcription fait intervenir des protéines nommées activateurs et répresseurs de la transcription, et des éléments de séquence particuliers impliqués soit dans l'activation (enhancers) ou dans la répression de la transcription (éléments régulateurs négatifs, silencers).

Un activateur transcriptionnel typique est composé d'un domaine de liaison spécifique à l'ADN et d'un domaine d'activation. Il existe différentes classes d'activateurs basées sur leur composition en acides aminés tels que des activateurs riches en glutamine, en sérine/thréonine, riche en proline ou en isoleucine. L'activateur VP16 du virus HSV2, par exemple, possède un domaine d'activation de type acide. Les activateurs sont généralement gènes-spécifiques.

Par leur domaine de liaison à l'ADN, les activateurs transcriptionnels se lient à des séquences d'ADN nommées enhancers. À ce moment, le domaine d'activation est en mesure de contacter certaines composantes de la machinerie transcriptionnelle et d'activer la transcription. Malgré des années de recherche, très peu de choses sont connues sur la façon dont l'interaction entre les activateurs et machinerie transcriptionnelles mène à l'activation.

Plusieurs étapes de la transcription sont ciblées par les activateurs, soit l'assemblage du complexe prétranscriptionnel (recrutement des FGT au promoteur), l'ouverture du promoteur (activités enzymatiques de TFIIF), le dégagement du promoteur (site de pause/arrêt), l'élongation de la transcription (phosphorylation du CTD) et d'autres. L'activation de la transcription peut être modulée par le nombre de sites de liaison aux activateurs sur le promoteur, la force du domaine de liaison à l'ADN et du domaine d'activation ainsi que la concentration d'activateurs dans le noyau cellulaire (revue dans Barberis et Gaudreau 1998).

Il existe deux façons d'activer la transcription. Dans la première, les activateurs peuvent cibler les composantes de la machinerie transcriptionnelle (facteurs généraux de transcription ou autres). C'est le cas avec l'activateur VP16 qui peut lier les facteurs TBP et TFIIB (Sigler *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1991). Les activateurs peuvent aussi cibler un intermédiaire tel un co-activateur. Les TAF_{II}, TFIIA, le médiateur et bien d'autres protéines (PC1 à PC4) sont des exemples de co-activateurs. Dans la deuxième, l'activateur peut contribuer à lever une barrière négative, un processus appelé anti-répression. L'anti-répression consiste à contrecarrer l'action des répresseurs soit par une interaction directe entre l'activateur et le répresseur ou via un co-activateur. TFIIA est un exemple de co-activateur qui est en mesure de contrecarrer l'action répressive de certains répresseurs dont MOT1, NC2 et TAF_{II}250 (Orphanides *et al.*, 1996; Lee et Young 1998).

La présence de répresseurs au cours de la transcription permet de réguler certaines étapes. Par exemple, la formation du complexe de préinitiation peut être ralentie par l'action des répresseurs MOT1 et NC2. MOT1 agit en dissociant TBP de la boîte TATA, tandis que NC2 se lie à TBP et empêche les liaisons subséquentes des autres facteurs (Lee et Young 1998). D'un autre côté, l'élongation de la transcription peut être réprimée par la présence des répresseurs DSIF et NELF. NELF régulerait l'élongation négativement en interagissant avec l'ARN pol IIA (Conaway *et al.*, 2000). Dans certaines conditions, les répresseurs peuvent agir comme stimulateurs de la transcription. Muldrow et collaborateurs (1999) ont démontré que MOT1, *in vitro*, pouvait aussi agir comme activateur faible de la transcription en quantité stoechiométrique avec TBP. Dans cette situation, MOT1 dissocie TBP de sites non-spécifiques sur l'ADN, le libérant ainsi pour des sites spécifiques telle la boîte TATA. DSIF stimulerait l'élongation de la transcription sous certaines conditions (Price 2000).

Le premier niveau de répression de la transcription est la chromatine. La condensation de l'ADN autour des nucléosomes rend inaccessible le promoteur pour la machinerie transcriptionnelle inhibant toute transcription. La chromatine peut être désorganisée par l'action des activateurs qui recrutent, au niveau de la chromatine, des complexes particuliers.

Ces complexes agissent comme des co-activateurs et sont de deux types: les complexes histones acétyltransférases (HAT) et les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendant.

Les complexes HAT sont présents chez tous les organismes eucaryotes tels que la levure (SAGA/ADA, NuA3-4), la drosophile (TFIID) et l'humain (TFIID, PCAF). Leur activité histone acétyltransférase est assurée par les protéines Gcn5, TAF_{II}250 (drosophile et humain) et PCAF, respectivement (Mizzen *et al.*, 1996; Lee et Young 1998; Brown *et al.*, 2000). Ces complexes acétylent la queue des histones formant l'octamère dans le nucléosome et provoquant une désorganisation de la structure supérieure de la chromatine. Les nucléosomes quant à eux, sont encore intacts (Kornberg 1999). Le processus d'acétylation est réversible et l'étape de déacétylation est assurée par des complexes histones déacétylases (HDAC) tels que mSIN3 et NURD chez l'humain.

Les complexes de remodelage de la chromatine viennent compléter la désorganisation de la chromatine, d'une manière ATP dépendante, en ciblant les nucléosomes. Il existe deux familles de complexes de remodelage qui agissent de façons différentes. La famille SWI/SNF perturbe la structure du nucléosome, tandis que la famille ISWI relocalise les nucléosomes sur l'ADN (Kornberg 1999). Il est à noter que les complexes de remodelage de la chromatine peuvent être associés avec la machinerie transcriptionnelle.

La répression de la transcription peut se faire par l'action de protéines liant des séquences répressives telles que les silencers classiques ou non classiques (Ogbourne et Antalis 1998; Udvary 1999). Les silencers classiques sont de courtes séquences d'ADN spécifiques dont la position dans le gène importe peu, pourvu qu'ils soient situés en amont du promoteur (Ogbourne et Antalis 1998). L'action des silencers classiques est généralement d'interferer dans l'assemblage des facteurs transcriptionnels. Quant aux silencers non classiques, nommés NRE (*negative regulatory element*), ils sont positionnés à des endroits précis sur les gènes et sont liés par des répresseurs. La combinaison NRE-répresseur se nomme alors

Insulator. Les Insulators sont des répresseurs très puissants qui interfèrent avec l'action des enhancers non-spécifiques au gène de façon à ce que celui-ci soit régulé uniquement par les enhancers qui lui sont spécifiques (figure12) (revue dans Udvardy 1999).

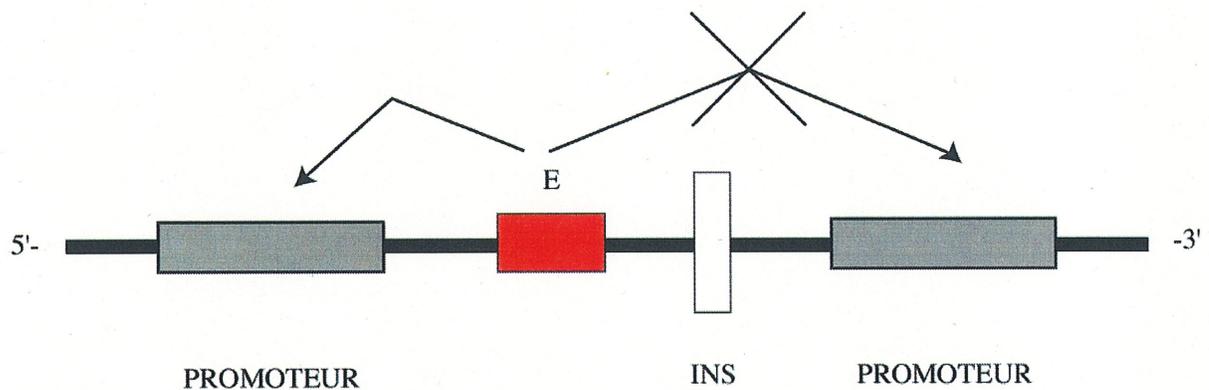
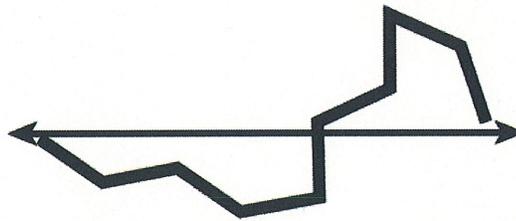


Figure 12. Schématisation d'un Insulator et de son rôle dans l'inhibition d'enhancers non-spécifiques à un gène. E, enhancer; INS, Insulator (Udvardy 1999)

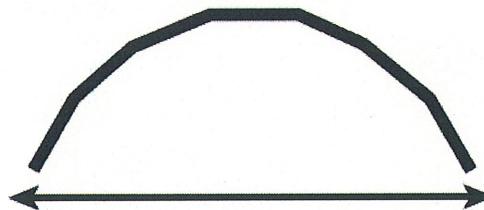
1.5 Topologie de l'ADN

Lors de l'initiation de la transcription, l'ADN s'enroule autour de l'ARN pol II afin de former le complexe prétranscriptionnel (Robert *et al.*, 1998; Douziech *et al.*, 2000). Pour qu'il y ait enroulement de l'ADN, ce dernier doit posséder une certaine flexibilité de séquence de façon à accepter les tensions nouvellement créées par l'enroulement. Il est possible que la topologie de l'ADN du promoteur, donnée par sa séquence (Fig. 13) (Hagerman 1985), dicte la force transcriptionnelle du promoteur en favorisant ou non l'enroulement de l'ADN.

COURBURES DISPOSÉES DE FAÇON ALÉATOIRE



COURBURES PHASÉES



COURBURES DÉPHASÉES



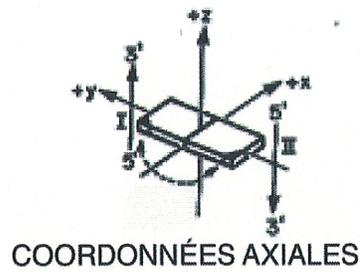
Figure 13. Conformation de l'ADN en fonction de sa séquence selon la disposition des séries d'adénines (Hagerman 1985)

Depuis la découverte de l'ADNk (ADN kinétoplastique) (Marini *et al.*, 1982; Hagerman 1984; Marini *et al.*, 1984), il est maintenant convenu que les séquences telles que des suites d'adénines (A_n) et de thymines (T_n), et des régions riches en A+T confèrent une structure particulière à l'ADN. La séquence n'agit plus seulement en tant qu'un simple alignement de bases ou de séquences spécifiques reconnues par des protéines, mais donne une structure tridimensionnelle à l'ADN lui conférant un rôle important dans la transcription.

1.5.1 Modèles

Plusieurs chercheurs se sont penchés sur le type d'interactions susceptibles de provoquer des changements structurels dans l'ADN. Le résultat de ces efforts a mené à l'aboutissement d'un code universel: le code Cambridge, établi en 1989, et basé sur le modèle de Dickerson-Calladine (Dickerson *et al.*, 1989). Le code Cambridge traite à la fois des distorsions présentes dans l'axe de l'ADN, paramètres globaux, et des distorsions présentes dans les bases, paramètres locaux (revue dans Amano *et al.*, 1997).

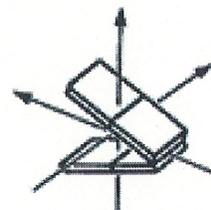
Les paramètres locaux consistent principalement en quatre angles de rotation. Trois de ces angles se situent entre deux paires de bases adjacentes (dinucléotide) et sont nommés *helical twist*, *roll* et *tilt* (Fig. 14). Le quatrième angle de rotation, quant à lui, se situe entre les bases formant une paire et se nomme *propeller twist* (Fig. 14). Le *helical twist* est responsable de la forme hélicoïdale de l'ADN. Le *roll* peut compresser le sillon majeur (*roll* positif) ou le sillon mineur (*roll* négatif) d'un angle de 45° et 15° , respectivement. Le *tilt* peut induire un angle de rotation dans le dinucléotide mais de moindre importance que le *roll*. Seul le *roll* et *tilt* sont en mesure de changer la direction de l'ADN. La particularité du *propeller twist* est d'empêcher la formation d'un plan entre les paires appariées, mais aussi entre les bases avoisinantes créant une inclinaison à l'intérieur du dinucléotide (Dickerson *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 1996).



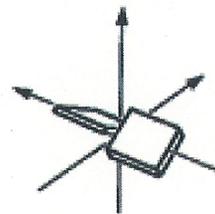
HELICAL TWIST



ROLL



TILT



PROPELLER TWIST

Figure 14. Représentation schématique des principaux angles de rotations retrouvés au niveau des dinucléotides ou au sein d'une paire de bases (Dickerson *et al.*, 1989)

Deux modèles tentent d'expliquer le comportement de l'ADN en fonction de sa séquence. Le premier modèle, inspiré par Trifonov dans les années 1980, se nomme le *Wedge model* (Fig. 15b) (Trifonov et Sussman 1980). Ce modèle stipule que le dinucléotide ApA démontre la plus forte inclinaison entre ses paires de bases (*propeller twist* élevé) par rapport aux autres dinucléotides possibles. En accumulant chacune de ces inclinaisons dans une série d'adénines (A_n), la distorsion imposée à la molécule d'ADN devient plus prononcée. Une série de cinq adénines (A_5) peut courber l'ADN d'un angle pouvant atteindre 18° (Koo *et al.*, 1986; Lilley 1986; Suzuki *et al.*, 1996). Le *wedge model* soulève aussi l'importance de la périodicité des séries A_n afin de produire une courbure macroscopique, c'est-à-dire visible par le ralentissement de la migration du fragment d'ADN courbé en gel de polyacrylamide non-dénaturant. Les résultats obtenus par Plakson et Wartell (1987) démontrent que des séries A_n disposées aléatoirement dans l'ADN ne provoquaient aucune courbure. La périodicité est donc un élément clé à la formation d'une courbure macroscopique.

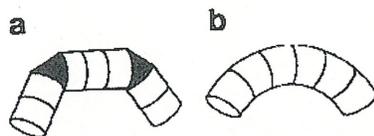


Figure 15. Modèle des courbures. a) Modèle des jonctions (*Kink model*) de Crick et Klug, et b) *Wedge model* de Trifonov (Suzuki *et al.*, 1996)

Le second modèle, le *junction model* ou *kink model* (Fig. 15a), proposé par Crick et Klug au cours des années 1975, dit qu'il est plus aisé, d'un point de vue mécanique, de plier une molécule d'ADN à quelque endroits afin de créer une courbure (revue dans Suzuki *et al.*, 1996). Les séries A_n correspondent bien à ce modèle. En effet, la série A_n adopte des caractéristiques intermédiaires entre la forme ADN-B et ADN-A et est nommée ADN-B' ou ADN-H (hétéronome) (Arnott *et al.*, 1983; McNamara et Harrington 1991). C'est à la

jonction des forme B-B' et B'-B qu'il y aurait une flexion induite dans l'ADN provoquant une courbure (Fig. 16).

Il semble donc y avoir un accord entre les deux modèles quant à la présence de séries d'adénines responsables d'un changement conformationnel de l'ADN. Cependant, la tendance se dirige davantage vers l'acceptation du *junction model*. Des études ont démontré que l'interruption d'une série d'adénines, peu importe la base utilisée, annule la courbure induite par la série A_n. Ceci est observable en gel de polyacrylamide non-dénaturant où le fragment contenant une série d'adénines interrompue migre selon sa taille réelle (Koo *et al.*, 1986, revue dans Hagerman 1990). Ceci réfute le *Wedge model* puisque selon ce dernier, la série d'adénines interrompue courberait encore dû à la présence des autres dinucléotides ApA.

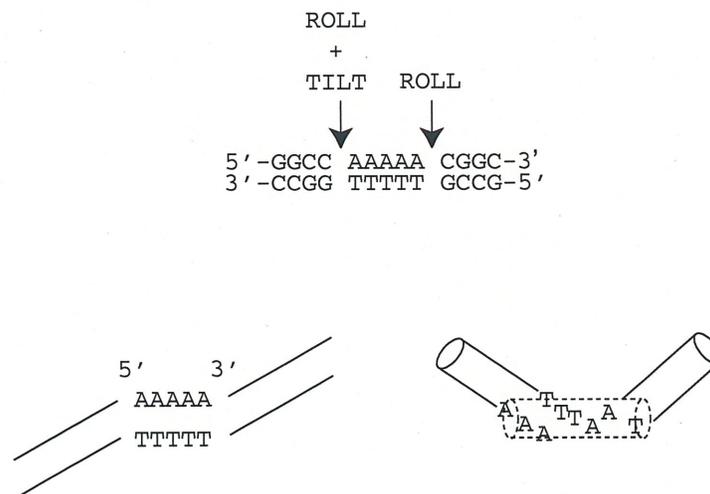


Figure 16. Représentation du changement conformationnel de l'ADN selon le modèle des jonctions (Sinden 1994)

1.5.2 Séquences courbées et flexibles

Pour qu'une séquence d'ADN puisse courber, celle-ci doit contenir une série d'adénines. La longueur optimale pour qu'une série d'adénines induise une courbure est de 4 à 6 adénines consécutives. Deux facteurs peuvent influencer l'amplitude de la courbure, soit les bases adjacentes à la série A_n et la façon dont les séries sont phasées entre elles. Par exemple, la série $CA_{4-6}T$ ou $CA_{4-6}C$ ($GA_{4-6}G$) ne courbe pas l'ADN avec le même angle. La présence des bases C et T en 5' et 3', respectivement de la série, influence davantage l'angle de la courbure que les bases C, C ou G, G (Koo *et al.*, 1986). De plus, la courbure devient maximale lorsque les extrémités 5' et 3' des séries d'adénines sont phasées l'une par rapport à l'autre.

Malgré le fait que les séries A_n provoquent une courbure, il n'en reste pas moins qu'à l'intérieur de la série se trouve une forte rigidité de séquence. Rhodes (1979) et Simpson et Kunzler (1979) ont démontré qu'une série d'adénines s'avère aussi rigide qu'une série de guanines (G_n). Selon la longueur de la série A_n , celle-ci peut se retrouver soit partiellement incluse (courte série), soit totalement exclue (longue série) de la formation d'un nucléosome (Rhodes 1979; Simpson et Kunzler 1979; Kunkel et Martinson 1981; Prunell 1982). Sachant que l'ADN du promoteur s'enroule autour de l'ARN pol II dans le complexe de préinitiation, la présence d'une série d'adénines peut nuire à cet enroulement. Nelson et collaborateurs (1987) expliquent cette rigidité par la présence d'un troisième lien hydrogène non Watson-Crick entre l'azote N6 de l'adénine et l'oxygène O4 de la thymine de la paire de bases suivante (Fig. 17). La présence d'un faible *helical twist* et d'un *propeller twist* élevé dans le dinucléotide AA/TT renforce l'hypothèse de la rigidité (Sarai *et al.*, 1989; El Hassan et Calladine 1996).

Les régions A+T riches sont considérées comme étant très flexibles. Ceci découle du fait que le dinucléotide AT/TA démontre une grande fluctuation au niveau de l'*helical twist* et du *roll*. Ce dernier peut subir soit un déroulement (*untwist*) ou un surenroulement

(*supertwist*), ce qui lui donne une grande flexibilité (Sarai *et al.*, 1989). Grâce à ces caractéristiques, la séquence A+T riche démontre un minimum de contraintes quant à la conformation qu'elle peut prendre.

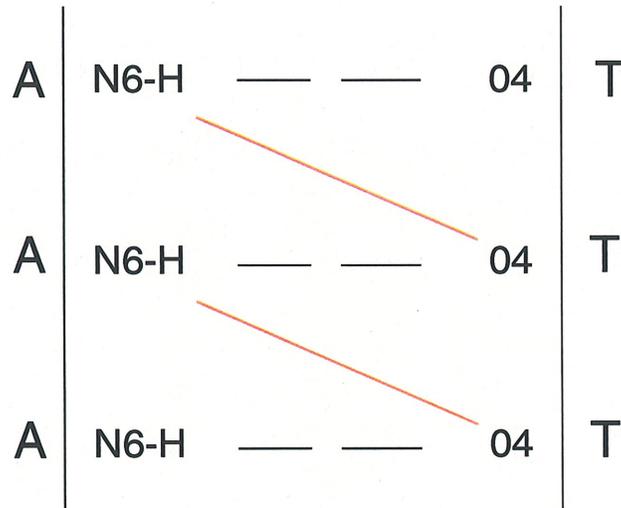


Figure 17. Schématisation du troisième lien hydrogène non Watson-Crick entre le N6 de l'adénine et le O4 de la thymine suivante (Nelson *et al.*, 1987)

Il existe un autre groupe de chercheurs qui soutient l'idée qu'une séquence d'ADN peut courber sans la présence de séries d'adénines (Bolshoy 1991; McNamara et Harrington 1991; Brukner *et al.*, 1993). Lorsque des séries de guanines-cytidines (GGGCCC) sont déphasées par rapport à des séries A_n , il y a annulation de la courbure induite par la présence de la série A_n (Brukner *et al.*, 1993). Cependant, un fragment d'ADN contenant uniquement des séries GGGCCC ne voit pas sa migration ralentir dans un gel de polyacrylamide non-dénaturant. Ceci indique que la courbure induite par les séries GGGCCC est moins

prononcée que celle induite par les séries A_n (Bruckner *et al.*, 1993; McNamara et Harrington 1991).

1.5.3 Rôle de la séquence d'ADN en transcription

Après la découverte de séquences pouvant conférer une structure particulière à l'ADN, une série d'études ont vu le jour. Ces études avaient principalement pour objectif d'étudier le rôle de ces structures dans les séquences promotrices. Plakson et Wartell (1987) découvraient une région courbée en amont du site d'initiation de la transcription chez certains promoteurs procaryotes. De ceci, ces auteurs ont établi un lien entre ces régions courbées et la force d'initiation de la transcription des promoteurs *in vivo*. Les régions riches en A+T ont par la suite été identifiées et impliquées dans la transcription. Par exemple, Asayama et collaborateurs (1999) ont démontré que la région riche en A+T présente dans le promoteur procaryote RpoD1 est nécessaire pour la liaison de l'ARN pol au promoteur et que, sans cette séquence, la transcription est très réduite. Cette séquence riche en A+T située de -40 à -200, par rapport au site d'initiation, a été nommée élément UP et se retrouve dans un très grand nombre de promoteurs procaryotes (Gaal *et al.*, 1994). L'élément UP interagit avec la sous-unité α de l'ARN polymérase bactérienne, stimulant la transcription en contribuant à l'enroulement de l'ADN autour de l'ARN polymérase (Aiyar *et al.*, 1998). Il semble donc que les séquences d'ADN influencent l'efficacité transcriptionnelle d'un promoteur différemment de ce qui avait été imaginé auparavant.

Pour montrer l'équivalence de fonction existant entre une courbure intrinsèque dans l'ADN et une courbure induite par la liaison d'une protéine à l'ADN, des chercheurs ont interchangé la région contenant le site de liaison pour la protéine induisant une courbure avec une courbure synthétique dans le gène bactérien *gal* (Bracco *et al.*, 1989) et le gène *lac* (Gartenberg et Crother 1991). Ils ont constaté que la courbure synthétique est aussi efficace que la séquence initiale pour la transcription. Ceci assigne donc une importance significative pour la séquence d'ADN et son rôle actif dans la transcription.

Chez les eucaryotes, les éléments de séquence dans un promoteur (boîte TATA, Inr) sont très importants pour supporter la transcription en permettant la formation d'un complexe prétranscriptionnel. La force du promoteur est reliée à la séquence de ces éléments. Par exemple, le promoteur E4 de l'adénovirus contient une boîte TATA (TATATATA) et un Inr (TTTTACACC). Il en est de même pour le promoteur majeur tardif de l'adénovirus qui possède une boîte TATA dont la séquence est TATAAAA et un Inr dont la séquence est CTCACTCT. Or ces deux promoteurs ne possèdent pas la même activité transcriptionnelle. Le promoteur E4 est beaucoup plus faible que le promoteur majeur tardif de l'adénovirus. Récemment, Gralla et collaborateurs (2000) ont démontré que les séquences bordant les éléments TATA et Inr sont aussi impliquées dans la force transcriptionnelle du promoteur. En interchangeant des blocs de séquence prédéfinis entre les promoteurs E4 et le promoteur majeur tardif, ils ont constaté que l'efficacité de transcription du promoteur chimérique était modifiée. Le promoteur E4 contenant un bloc du promoteur majeur tardif voit son activité transcriptionnelle augmentée, tandis que le promoteur majeur tardif contenant un bloc de séquence de E4 voit son efficacité transcriptionnelle diminuée. Il semble donc que la séquence de l'ADN influence l'activité du promoteur autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes.

1.6 Objectif

Un objectif poursuivi par le laboratoire du Dr Coulombe est d'analyser l'organisation moléculaire du complexe de préinitiation contenant l'ARN pol II et les facteurs généraux de transcription TBP, TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF et TFIIH. L'initiation de la synthèse des ARNm nécessite la liaison de la machinerie transcriptionnelle de l'ARN pol II sur les promoteurs géniques. Cette liaison requiert une interaction entre la machinerie transcriptionnelle et des éléments de séquences tels que la boîte TATA (TATAa/tAa/t) et l'Inr (Inr: PyPyANt/aPyPy). Des études de photo-pontage protéines-ADN, de microscopie électronique et d'interactions protéine-protéine ont démontré que l'ADN du promoteur s'enroule de presque un tour autour de l'ARN pol II suite à l'entrée de TFIIF, plus

particulièrement de RAP74, dans le complexe de préinitiation (Forget *et al.*, 1997; Robert *et al.*, 1998; Douziech *et al.*, 2000).

Il est maintenant admis que l'ADN est non linéaire et qu'il adopte une conformation structurale dictée par sa séquence. Certaines séquences d'ADN telles que des séries riches en A+T ou des séries d'adénines (A_n) modifient davantage la conformation de l'ADN. Les séries A+T riches confèrent une flexibilité de séquence à l'ADN, tandis que les séries d'adénines courbent et rendent plus rigide l'ADN (Koo *et al.*, 1986; Nelson *et al.*, 1987; Sarai *et al.*, 1989; Dickerson 1998). Il est donc possible d'imaginer que lors de la formation du complexe d'initiation, l'ADN peut s'enrouler plus ou moins favorablement selon sa malléabilité autour de l'ARN pol II. L'enroulement de l'ADN peut alors influencer l'efficacité transcriptionnelle du promoteur.

L'objectif de mon projet de maîtrise est d'étudier l'effet de la topologie de l'ADN du promoteur sur la transcription par l'ARN pol II. L'activité transcriptionnelle de base varie d'un promoteur à l'autre. Certains promoteurs ont des activités transcriptionnelles totalement différentes même s'ils possèdent des boîtes TATA et Inr très semblables. Sachant que l'ADN doit s'enrouler autour de la machinerie transcriptionnelle, notre hypothèse est que la malléabilité de l'ADN (flexibilité/rigidité) bordant les éléments du promoteur peut favoriser ou défavoriser l'enroulement de l'ADN, jouant ainsi un rôle dans la force du promoteur basal.

CHAPITRE 2

EFFET D'UNE COURBURE ARTIFICIELLE DANS L'ADN DU PROMOTEUR SUR LA TRANSCRIPTION PAR L'ARN POLYMÉRISE II

2.1 Préambule

L'article présenté dans ce mémoire est intitulé "*Artificial Bending of Core Promoter DNA Modulates Basal Transcription by RNA polymerase II*". Il sera soumis au journal *Journal of Biological Chemistry*. J'ai réalisé la totalité des expériences présentées dans cet article.

Les travaux déjà réalisés dans le laboratoire du Dr Benoit Coulombe ont démontré que lors de l'initiation de la transcription, l'ADN du promoteur s'enroule autour du complexe prétranscriptionnel composé de l'ARN polymérase II et des facteurs généraux de transcription TBP, TFIIB, TFIIF, TFIIE et TFIIH. Il est connu que la séquence d'un fragment d'ADN dicte sa conformation (Hagerman 1990). Par exemple, une série d'adénines courbe et rigidifie l'ADN, tandis que les séries A+T riche rend l'ADN flexible. Selon la malléabilité de l'ADN (flexibilité/rigidité) l'enroulement de l'ADN autour du complexe prétranscriptionnel peut être favorisé ou non modulant ainsi la force transcriptionnelle du promoteur. L'article qui suit démontre que la topologie de l'ADN influence la force transcriptionnelle soit positivement ou négativement, et met en évidence certains mécanismes pouvant être impliqués dans ce phénomène.

3.2 Article

PORLIER, Y. et B. COULOMBE. 2001. Artificial bending of core promoter DNA modulates basal transcription by RNA polymerase II. Pour soumission à J. Biol. Chem.

Title:

Artificial Bending of Core Promoter DNA Modulates Basal Transcription by
RNA Polymerase II

By

Yanie Porlier and Benoit Coulombe*

Département de biologie
Faculté des sciences
Université de Sherbrooke
2500 boulevard Université
Sherbrooke QC J1K 2R1
Canada

Tel: (819) 821-8000 (Ext. 1092)

Fax: (819) 821-7083

E-mail: b.coulom@courrier.usherb.ca

* Corresponding Author

Abstract

Initiation of mRNA synthesis by mammalian RNA polymerase II (RNAPII) requires the formation of a pre-initiation complex containing RNAPII and the general transcription factors TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIF and TFIIH on promoter DNA. In the presence of hydrolysable ATP, the pre-initiation complex is capable of melting promoter DNA at the transcription initiation site. Both the formation of the pre-initiation complex and promoter melting necessitate DNA wrapping around RNAPII. Because of the role of DNA wrapping in transcription initiation, we hypothesized that the natural curvature of promoter DNA may influence basal promoter strength. To test this idea, we introduced A-tracts, which induce a bend of approximately 18° in DNA, at various positions along the Adenovirus major late promoter (AdMLP). Depending on the position of the A-tracts, we observed a variation in basal transcription activity of the promoter variants, some being stronger and others weaker than the wild type promoter. Two of our mutants, which place the A-tracts either immediately downstream of the TATA box (GML108; A₅ -23/-19) or in the vicinity of the transcription start site (GML162; A₅ -1/+4), are impaired in basal transcription. Investigation of pre-initiation complex assembly on the promoter mutant GML108 (A₅ -23/-19) indicated that DNA bending affects the formation of the TBP-DNA and TBP-TFIIB-DNA complexes, but not the assembly of larger complexes also containing TFIIE, TFIIF and RNAPII. Our results support the notion that DNA bending and wrapping play a major role in transcription initiation and reveal a novel mechanism for gene regulation.

Introduction

RNA polymerase II (RNAPII), the eukaryotic enzyme responsible for mRNA synthesis, interacts with the general transcription factors TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIF and TFIIH to form the pre-initiation complex on promoter DNA. The first step of pre-initiation complex formation is the sequence-specific recognition of promoter DNA. Two DNA sequence elements are often used for specific recognition of class II promoters: the TATA box which is bound by the TATA box-binding protein TBP, and the initiator (Inr) which is bound by a TBP-associated factor (TAF_{II}) and some other proteins (1). The exact sequence of the TATA box influences the affinity and the specificity of TBP binding to various promoters (2-4). A decrease in the stability of the TBP-DNA complex was shown to often correlate with a decrease in transcription efficiency (5), indicating that the TATA box regulates core promoter strength. Recently, a GC-rich sequence element called the TFIIB Recognition Element (BRE) was localized upstream of the TATA box of several promoters. The BRE enhances the binding of TFIIB to the TBP-DNA complex and stimulates basal transcription *in vitro* (6). In prokaryotes, an A+T-rich region and the presence of A-tracts phased with the helical pitch of the DNA have been implicated in promoter activation (7). The classical vision stipulating that DNA is a linear molecule is now replaced by the idea that free DNA can adopt a tri-dimensional conformation (8). For example A+T-rich sequences are known to be flexible, allowing DNA to adopt various conformations in space (9,10). On the other hand, A-tracts were shown to induce the bending of DNA fragments (11).

Photo-cross-linking experiments demonstrated that the assembly of the pre-initiation complex *in vitro* is accompanied by wrapping of the promoter DNA around RNAPII (12,13). Promoter wrapping is initiated by the formation of a 90° bend induced by the binding of TBP to the TATA box (14,15). The presence of TFIIF, particularly its RAP74 subunit, in the pre-initiation complex is responsible for DNA wrapping for almost a full turn around the RNAPII (12). DNA wrapping is tightened by the association of TFIIH with the

complex. In the presence of ATP, the helicase activities of TFIIH catalyzes promoter melting in the vicinity of the initiation site (13).

To assess the influence of DNA topology on promoter strength, we introduced A-tract, which induces a bend of approximately 18° in DNA (11), at various positions along the core AdMLP. The basal transcription activity of the various mutants was analyzed. Two promoter mutants impaired for basal transcription activity were analyzed for their ability to assemble pre-initiation complexes in the presence of RNAPII and general transcription factors.

Materials and Methods

Mutagenesis

A-tracts (A_5) were substituted in the AdMLP by PCR site-directed mutagenesis using *Taq* polymerase (Promega). The DNA fragments containing mutated AdMLP were cloned into the plasmid pBluescript. All the promoter variants were sequenced.

In vitro transcription

In vitro transcription assays were performed as previously described (17). Briefly, plasmid DNA containing the promoter variants was linearized with the restriction enzyme *EcoRI* in order to produce a 400-nt run-off transcript, and incubated with a HeLa nuclear extract. Alternatively, the *in vitro* transcription assays were performed in a reconstituted system containing supercoiled DNA and highly purified factors including 1 pmol of each TBP, TFIIB, RAP30, RAP74, TFIIE34, and TFIIE56, and 0,3 pmol of RNA polymerase II. Each reaction also contained a control template consisting of the wild type AdMLP linearized with the restriction enzyme *SspI* in order to produce a 200-nt run-off transcript. Quantification of the run-off transcripts was performed using a phosphorimager (Molecular Dynamics). *In vitro* transcriptions using the various promoter mutants were repeated three times.

Primer extension

A 30-nt oligonucleotide was labeled using T4 polynucleotide kinase (Pharmacia) in the presence of γ - ^{32}P [ATP]. The oligonucleotide annealed between positions +37 and +67 of the AdMLP. Primer extension reactions were performed as previously described (18).

Gel shifts

Plasmid DNA containing the AdMLP was digested using the restriction enzymes *BamHI* and *DraI*, and the 110-bp fragment containing the promoter was filled-in using the Klenow fragment of DNA polymerase in the presence of α -³²P [dGTP]. Gel shifts were performed as described previously (16). Complexes were assembled using highly purified TBP (2.7 pmol), TFIIB (0,7 pmol), RNAPII (0.3 pmol), RAP30 (7 pmol), RAP74 (10 pmol), TFIIE34 (2.3 pmol) and TFIIE56 (2.8 pmol). For the determination of dissociation constants, the concentration of TBP varied from 0.3 to 11 pmol for the wild type promoter (GML33) and 1 pmol to 21 pmol for the promoter mutant GML108 (A₅ -23/-19)

Results and discussion

DNA bending induced by an A-tracts

To modify the topology of DNA fragments containing the AdMLP, we used site-directed mutagenesis to introduce A₅-tracts at various positions between the TATA box and the Inr (figure 1). The presence of an A₅-tract has been reported to induce a bend of approximately 18° in the DNA (11). As shown in figure 2, the introduction of an A₅-tracts in a 80-bp DNA fragment (N/A₅) reduced the mobility of the fragment on a native polyacrylamide gel, indicating the presence of a bend. Interruption of the A-tracts by an A-to-G mutation that changes 5'-AAAAA-3' to 5'-AAGAA-3' restored the normal migration of the DNA fragment, supporting the idea that the A-tract is responsible for DNA bending (11). Our results indicate that the introduction of an A-tract in a DNA fragment containing the AdMLP induces DNA bending.

Transcriptional activity of promoter mutants

The basal transcription activity of the various promoter mutants was assayed using run-off transcription in a HeLa nuclear extract. Depending on the position of the A-tracts, we observed a variation in the transcription activity (figure 3). This observation indicates that modulation of DNA bending within a promoter fragment influences its basal transcription activity *in vitro*. Notably, two promoter variants, GML108 which contains an A-tract immediately downstream of the TATA box (positions -23/-19), and GML162 which contains an A-tract in the region of the transcription start site (positions -1/+4), showed a substantial decrease in basal transcription activity (0,5-fold and less than 0,1-fold the activity of the wild type promoter respectively). Both promoter mutants were also analyzed for *in vitro* transcription activity using a system reconstituted from the purified general transcription factors and RNAPII. Primer extension experiments performed with the transcription products showed *i*) that transcription is accurately initiated on both GML108

(A₅-23/-19) and GML162 (A₅-1/+4), and *ii*) confirmed that basal transcription is decreased at these promoters (figure 4). To ensure that the effect on basal transcription is due to the topology of promoter DNA, and not only to a change in the DNA sequence, we interrupted the A-tracts (AAAAA-to-AAGAA) in both promoter variants and assayed these genotypic revertants for basal transcription activity. GML208 (GML108 revertant) and GML209 (GML162 revertant) both produced run-off transcripts with efficiencies similar to the wild type promoter (figure 4). Together, these results indicate that the topology of the DNA influences core promoter strength *in vitro*.

Pre-initiation complex assembly

In order to understand how DNA bending immediately downstream of the TATA box and in the vicinity of the initiation site of the AdMLP can decrease basal transcription *in vitro*, we decided to analyze pre-initiation complex assembly on the promoter mutants. GML108 (A₅-23/-19) was unable to support the formation of stable TBP-DNA and TBP-TFIIB-DNA complexes, whereas larger complexes including TBP-TFIIB-TFIIF-RNAPII-DNA and TBP-TFIIB-TFIIF-RNAPII-TFIIE-DNA were obtained (figure 5). Because TBP-DNA and TFIIB-TBP-DNA complexes assemble efficiently on promoter GML208 (the genotypic revertant of GML108), the presence of the curvature in GML108 is most certainly responsible for the defects in early steps of pre-initiation complex assembly. To analyze in further detail the interaction of TBP with the TATA box of GML108 (A₅-23/-19), we measured the dissociation constant (K_D) using gel shift experiments (Table 1). We observed that the affinity of TBP for GML108 and the wild type promoter are very similar, indicating that TBP recognizes efficiently both TATA boxes. Hawley and coworkers (5) have showed that TBP has a tendency to dissociate from the DNA probe during electrophoresis. The absence of dissociation of the TBP-GML33 complex as opposed to the TBP-GML108 complex suggests that the association of TBP with the variant promoter GML108 is unstable (figure 5).

The A-tract in GML108 is in phase with the A-tract of the TATA box (TATAAAA) and likely amplifies the overall bending of this promoter fragment, possibly destabilizing the TBP-promoter interaction. Recent studies have demonstrated that the sequences flanking the TATA box influence the binding of TBP by altering the decay rate rather than the association rate (21). Another explanation for the instability of the TBP-GML108 complex is that the TATA box and the A-tract can form a secondary structure such as a four-way junction. For instance, when TBP induces a 90° bend in the DNA, this AT-rich sequence could melt and re-associate in a secondary structure that provokes the dissociation of TBP. According to our results, the presence of TFIIB alone is not sufficient to stabilize the TBP-DNA complex, but the presence of TFIIB along with TFIIE, TFIIF and RNAPII allows the formation of a stable complex. The instability of the TBP-GML108 interaction can account for the decrease in basal transcription activity.

Our gel shift experiments indicate that assembly of the pre-initiation complex using GML162 ($A_5 -1/+4$) and the wild type promoter are indistinguishable (figure 6), suggesting that the decrease in basal transcription activity of GML162 is not the result of a defect in pre-initiation complex formation. It is possible that the curvature in the region of the transcription start site affects the interaction of the DNA with either the catalytic center of RNAPII and/or one of the general initiation factor such as TFIIF, leading to a defect in promoter opening. Such a defect is expected because of the presence of a third non-Watson-Crick hydrogen bond in the A_5 -tract that increases the rigidity of this sequence (22). Notably, the adenovirus E4 promoter, which is a weak promoter in basal transcription assays but responds well to activation *in vitro*, contains a naturally occurring A_5 -tract in the region of its transcription start site. The weak basal activity of both GML162 ($A_5 -1/+4$) and the adenovirus E4 promoters may be due to the difficulty of the basal transcription machinery to melt the DNA at the start site.

Acknowledgments

We thank members of our laboratory for helpful discussions and Dr Luc Gaudreau for kindly providing the adenovirus E4 promoter. This research was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research. B.C holds a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

References

1. Chalkley, G.E., and Verrijzer, C.P. (1999) *EMBO J* **18**, 4835-45
2. Starr, D.B., Hoopes, B.C., and Hawley, D.K. (1995) *J Mol Biol* **250**, 434-46
3. Juo, Z.S., Chiu, T.K., Lieberman, P.M., Baikalov, I., Berk, A.J., and Dickerson, R.E. (1996) *J Mol Biol* **261**, 239-54
4. de Souza, O.N., and ORNSTEIN, R.L. (1998) *Biopoly.* **46**, 403-15
5. Hoopes, B.C., LeBlanc, J.F., and Hawley, D.K. (1992) *J Mol Biol* **267**, 11539-47
6. Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D., and Ebright, R.H. (1998) *Genes Dev* **12**, 34-44
7. Aiyar S.E., Gourse, R.L., et Ross, W. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 14652-7
8. Hagerman , P.J. (1990) *Annu. Rev. Biochem* **59**, 755-781
9. Dickerson, R.E. (1998) *Nucleic Acids Research* **26**, 1906-1926

10. Sarai, A., Mazur, J., Nussinov, R., and Jernigan, R.L. et al. (1989) *Biochemistry* **28**, 7842-9
11. Koo, H.-S., Wu, H-M., and Crothers, D.M. (1986) *Nature* **320**, 501-6
12. Robert, F., Douziech, M., Forget, D., Egly, J.-M., Greenblatt, J., Burton, Z.F., and Coulombe, B. (1998) *Mol Cell* **2**, 341-51
13. Douziech, M., Coin, F., Chipoulet, J.-M., Arai, Y., Ohkuma, Y., Egly, J.-M., and Coulombe, B. (2000) *Mol Cell Biol* **20**, 8168-77
14. Kim, J.L., Nikolov, D.B., and Burley, S.K. (1993) *Nature* **365**, 520-7
15. Kim, Y., Geiger, J.H., Hanh, S., and Sigler, P.B. (1993) *Nature* **365**, 512-20
16. Wolner, B.S., and Gralla, J.D. (2000) *Mol Cell Biol* **20**, 3608-15
17. Burton, Z.F., Ortolan, L.G, and Greenblatt, J. (1986) *EMBO J* **5**, 2923-30
18. Carey, M.F., Lin, Y.S., Green, M.R., and Ptashne, M. (1990) *Nature* **345**, 361-4
19. Lane, D., Prentki, P., and Chandler, M. (1992) *Micro. Rev.* **56**, 509-28.
20. Robert, F., Forget, D., Li, J., Greenblatt, J., and Coulombe, B. (1996) *J Mol Chem* **271**, 8517-20
21. Wolner, B.S., and Gralla, J.D. (2000) *J. Biol. Chem.* published November 28,

22. Nelson, H.C.M., Finch, J.T., Bonaventura, F.L., Klug, L., and Klug, A. (1987) *Nature*
330, 221-6

Table 1. Dissociation constant of TBP-promoter complexes^a :

Promoter	K_D (M)
GML33 (wt)	20
GML108 (A ₅ -23/-19)	18

^a Values are the average of 2 to 3 experiments

Figure legends

Figure 1. The AdMLP mutants with A₅-tracts. The black dot shows the central base of the A-tracts (A₅). The TATA box is shown in boldface and the transcription initiation site is indicated by an arrow.

Figure 2. Electrophoretic mobility in a native polyacrylamide gel of an 80-bp DNA fragment either lacking (N/A wt) or containing (N/A-A₅) an A₅-tract. In the DNA fragment N/A-A₂GA₂, the A-tracts of N/A-A₅ has been interrupted by a A-to-G mutation (AAAAA to AAGAA). The sequence of each fragment is shown.

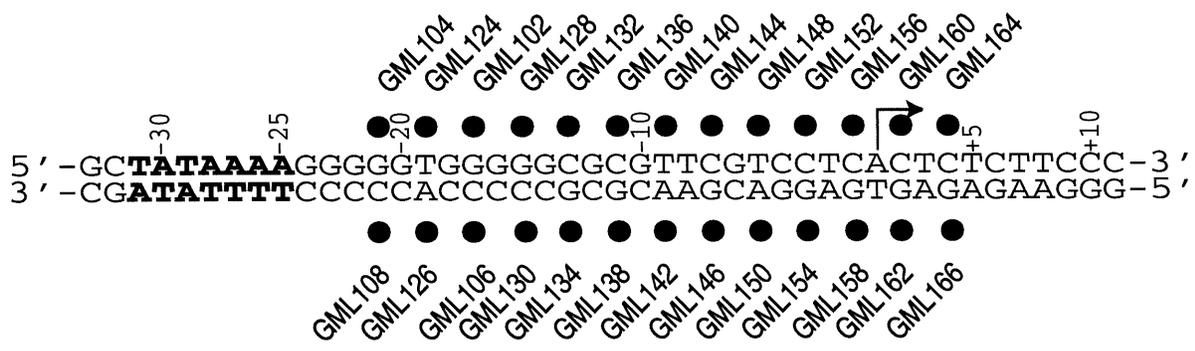
Figure 3. Comparison of basal transcription activity of AdMLP mutant and wild type promoters. *In vitro* transcription assays were performed with a HeLa nuclear extract and contained 300 ng of plasmid DNA with the AdMLP linearized using the restriction enzyme *EcoRI* (wild type and mutants). Plasmid DNA containing the wild type AdMLP and linearized using the restriction enzyme *SspI* has been included in each reaction as an internal control (see text). A gray line indicates the transcription activity of the wild type promoter. Values are the average of 2-3 experiments each.

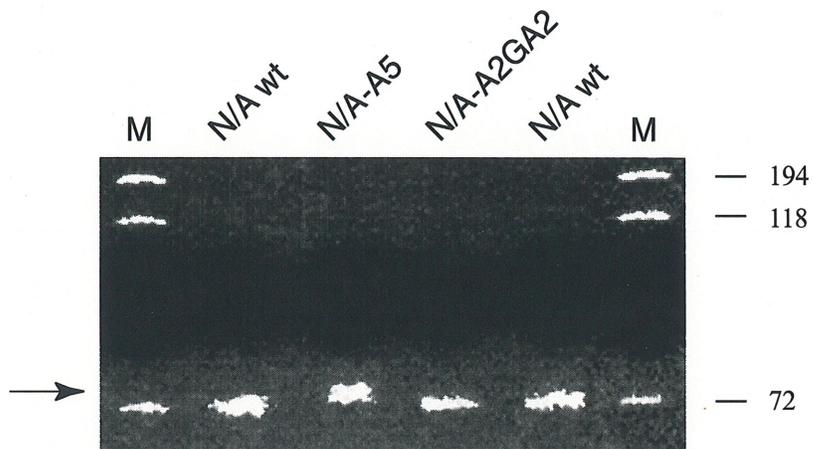
Figure 4. Primer extension of the *in vitro* transcription products obtained with the promoter mutants GML108 and GML162, and the genotypic revertants GML208 and GML209. The positions of the free probe and the extended primer are indicated.

Figure 5. Pre-initiation complex assembly using promoter GML108. Pre-initiation complexes were assembled using various combinations of the general transcription factors TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIF, and RNAPII on probes containing promoters GML108 (A₅ -23/-19) and GML208 (G-to-A revertant of GML108). Probe GML33, which contains the wild type AdMLP, is included. Probe GML34, which contains the AdMLP with a mutated TATA

box (TATAAAA to TAGAGAA), is used as a negative control. The probes were a 110-bp DNA fragment containing the AdMLP (wild type and mutants) from -60 to +50. The position of the various complexes is indicated.

Figure 6. Pre-initiation complex assembly using promoter GML162. Complexes were assembled as described in the legend to figure 5, except that promoters GML162 (A₅-1/+4) and GML209 (G-to-A revertant of GML162) were used.





N/A wt :

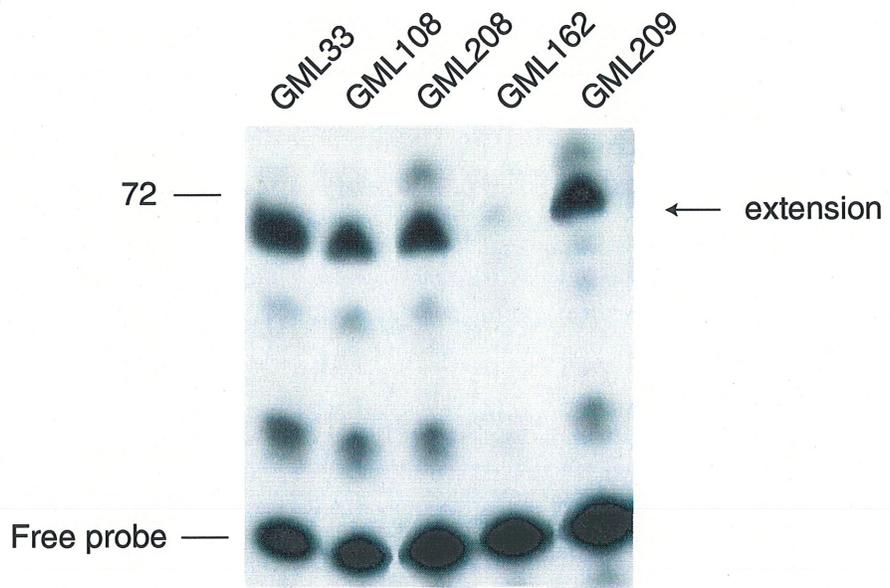
5'-GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCT**TAATG**CGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCCATTCAGGCTGCG-3'

N/A-A5 :

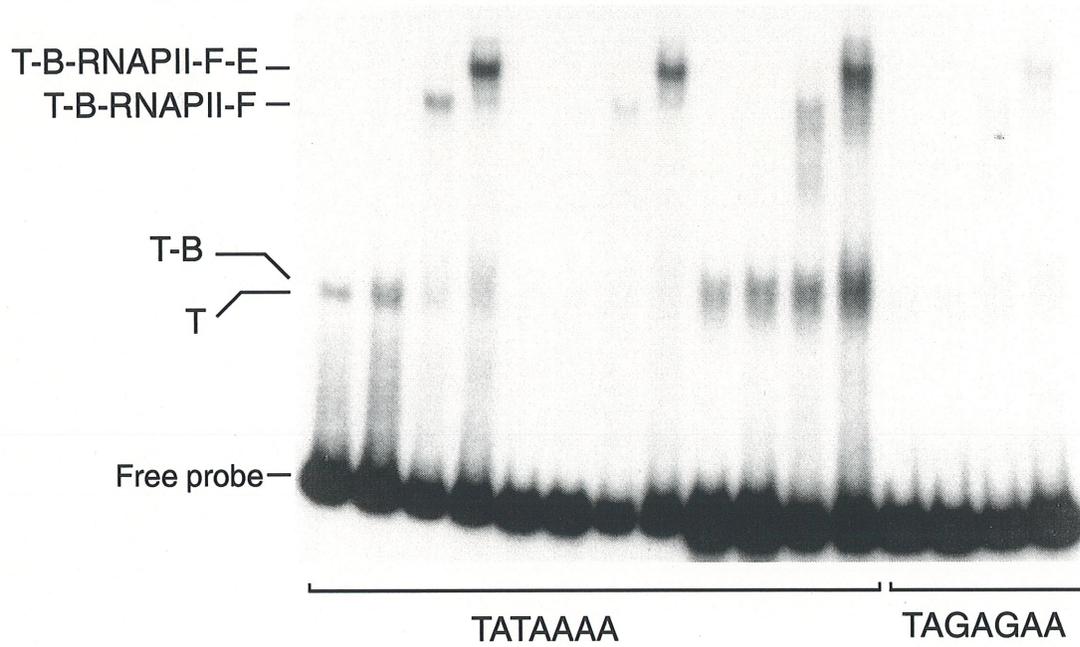
5'-GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCT**CAAAA**AGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCCATTCAGGCTGCG-3'

N/A-A2GA2 :

5'-GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCT**CAAGA**AGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCCATTCAGGCTGCG-3'



	GML33 (wt)				GML108				GML208				GML34			
TFIIE :	+				+				+				+			
TFIIF :	+		+		+		+		+		+		+		+	
RNAPII :	+		+		+		+		+		+		+		+	
TFIIB :	+		+		+		+		+		+		+		+	
TBP :	+		+		+		+		+		+		+		+	

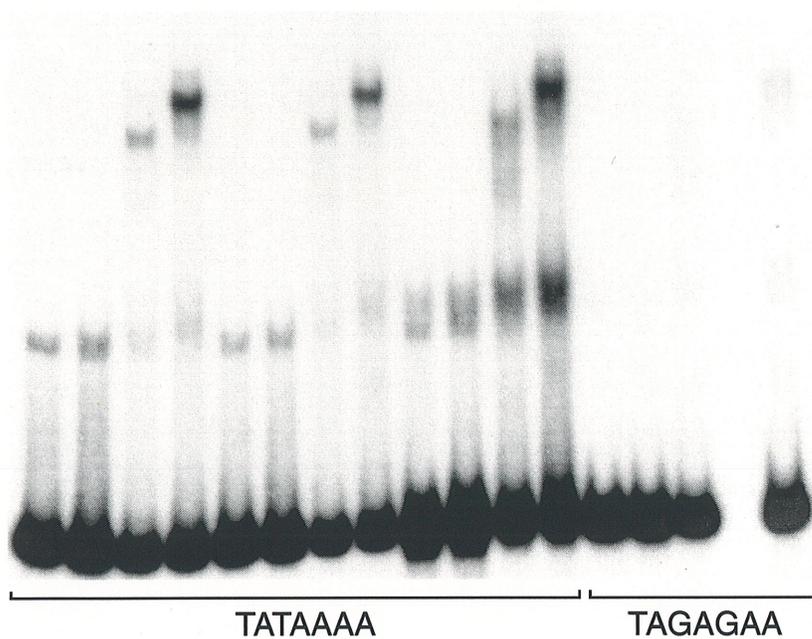


	GML33 (wt)				GML162				GML209				GML34			
TFIIE :				+				+				+				+
TFIIF :		+	+			+	+			+	+			+	+	
RNAPII:		+	+			+	+			+	+			+	+	
TFIIB :		+	+	+		+	+	+		+	+	+		+	+	+
TBP :	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

T-B-RNAPII-F-E-
T-B-RNAPII-F-

T-B
T

Free probe -



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux déjà réalisés dans le laboratoire du Dr Benoit Coulombe (Forget *et al.*, 1997; Robert *et al.*, 1996; 1998; Douziech *et al.*, 2000) ont démontré que lors de l'initiation de la transcription, l'ADN du promoteur s'enroule autour du complexe prétranscriptionnel qui est composé de l'ARN pol II et des facteurs généraux de transcription TBP, TFIIB, TFIIF, TFIIE et TFIIH. Les protéines TBP et TFIIF jouent un rôle particulièrement important dans l'enroulement de l'ADN autour du complexe prétranscriptionnel. Tout d'abord TBP, en se liant à la boîte TATA, induit une courbure de 90° dans l'ADN. Par la suite, la présence de TFIIF, via sa sous-unité RAP74, poursuit l'enroulement de l'ADN de presque un tour autour de l'ARN pol II. Le présent travail est basé sur l'hypothèse suivante: selon la malléabilité de l'ADN (flexibilité/rigidité), qui est dictée par sa séquence, l'enroulement de l'ADN autour du complexe prétranscriptionnel peut être favorisé ou non, modulant ainsi la force transcriptionnelle du promoteur. L'objectif de mon projet de maîtrise était d'étudier l'effet de la topologie de l'ADN du promoteur sur la transcription basale par l'ARN pol II. Puisqu'il est possible de modifier la topologie de l'ADN en introduisant une série d'adénines dans l'ADN, nous avons utilisé la technique de mutagenèse dirigée par PCR, pour substituer une série de cinq adénines, courbant l'ADN de 18° (Koo *et al.*, 1986), à différentes positions le long du promoteur majeur tardif de l'Adénovirus entre les positions -25 et +4. Selon la position de la courbure, une variation dans l'activité transcriptionnelle basale des mutants de promoteur a été observée, dont certains sont plus actifs et d'autres moins actifs que le promoteur sauvage.

Le mutant GML108 possède une courbure artificielle située immédiatement en aval de la boîte TATA (Fig. 1, Chapitre 2). Les essais de transcription *in vitro* ont démontré que GML108 possède une activité transcriptionnelle de moins de 50% par rapport au promoteur sauvage (Fig. 3, Chapitre 2). Les résultats obtenus en gel de retardement ont révélé que GML108 a une déficience au niveau de la formation du complexe TBP-ADN ou TFIIB-

TBP-ADN (Fig. 5 Chapitre 2). Cependant la formation de complexes composés de TBP, TFIIB, TFIIF, l'ARN pol II et TFIIE n'est pas affectée.

Il est possible de penser que la reconnaissance de la boîte TATA de GML108 est affectée par la présence de la courbure. Or, l'affinité de TBP pour la boîte TATA de GML108 est identique à celle pour la boîte TATA du promoteur sauvage, 18 nM et 20 nM respectivement. Il semble donc que la courbure affecte la liaison de TBP à l'ADN d'une autre façon. Hawley et collaborateurs (1992) ont démontré que TBP a tendance à se dissocier de l'ADN durant la migration en gel de polyacrylamide. L'absence de dissociation du complexe TBP-ADN sauvage contrairement au complexe TBP-ADN GML108 suggère que l'association de TBP avec la boîte TATA de GML108 est instable. La détermination des constantes de cinétique K_{on} (vitesse d'association) et K_{off} (vitesse de dissociation), nous permettrait de vérifier cette hypothèse.

La série d'adénines de GML108 se trouve phasée avec celle de la boîte TATA (TATAAAA), résultant selon toute vraisemblance en une courbure amplifiée. Cette courbure amplifiée pourrait contribuer à déstabiliser l'interaction TBP-ADN. Des études récentes ont démontré que les séquences bordant la boîte TATA influencent la liaison de TBP, affectant la dissociation plutôt que l'association de TBP à la boîte TATA (Wolner et Gralla 2000a; 2000b). Cependant, l'étude de Wolner et Gralla ne permet pas de déterminer le mécanisme par lequel les séquences bordant TATA agissent. Je propose que la topologie de l'ADN, particulièrement sa courbure, joue un rôle significatif. Une explication alternative pour l'instabilité du complexe TBP-GML108 réside dans la possibilité que la boîte TATA et la série d'adénines puissent former une structure secondaire. Lors de la liaison de TBP à l'ADN, TBP induit une courbure de 90° dans l'ADN. La région A+T riche de la boîte TATA et de la série d'adénines pourrait se séparer et se réassocier en une structure secondaire telle que le *four way junction*, provoquant la dissociation de TBP de la boîte TATA.

Selon nos résultats, la présence de TFIIB seul, n'est pas suffisante pour stabiliser le complexe TBP-ADN. Cependant, en présence des autres facteurs généraux de transcription (TFIIE et TFIIF) et de l'ARN pol II, la liaison de TBP est maintenue. L'instabilité du complexe TBP-GML108 pourrait expliquer la faible activité transcriptionnelle basale de ce promoteur.

En ce qui concerne GML162, celui-ci possède une courbure artificielle située dans l'Inr (Fig. 1, Chapitre 2). Les essais de transcription *in vitro* ont démontré que l'activité transcriptionnelle basale de GML162 est inférieure à 10% comparée au promoteur sauvage. Cependant, GML162 est en mesure de former adéquatement les complexes TBP-ADN, TFIIB-TBP-ADN ainsi que les complexes supérieurs, suggérant que la faible activité transcriptionnelle n'est pas le résultat d'une incapacité à former un complexe prétranscriptionnel. Cependant, la technique de gel de retardement nous permet uniquement de déterminer s'il y a formation d'un complexe protéines-ADN et non de déterminer la structure du complexe. Dans le cas de GML108 et de GML162, la détermination de la structure du complexe prétranscriptionnel et de ses intermédiaires à l'aide de la technique de photo-pontage protéine-ADN pourrait fournir des informations extrêmement pertinentes. Le photo-pontage protéine-ADN permet de localiser les protéines à proximité de l'ADN. Ainsi, lors de l'enroulement de l'ADN autour du complexe prétranscriptionnel, un patron de contacts protéine-ADN a été établi (Robert *et al.*, 1998; Douziech *et al.*, 2000). La présence de la courbure artificielle située immédiatement en aval de la boîte TATA et dans l'Inr pourraient modifier certains contacts protéine-ADN et mettre en évidence des interactions essentielles pour une transcription basale efficace. Par exemple, il est possible que la courbure située dans la région du site d'initiation de la transcription affecte l'interaction de l'ADN avec le site catalytique de l'ARN pol II ou un facteur généraux de transcription tel que TFIIF, ce qui pourrait mener à une déficience dans l'ouverture du promoteur. Une telle déficience est possible dû à la présence d'un troisième lien hydrogène, non Watson-Crick, à l'intérieur de la série d'adénines, ce qui rend plus rigide la séquence d'ADN (Nelson *et al.*, 1987). Des expériences d'empreintes au permanganate, une méthode qui permet de mettre

en évidence les régions simple-brin dans un fragment d'ADN, pourraient répondre à cette hypothèse.

À la lumière de nos résultats, la topologie de l'ADN du promoteur basal influence sa force transcriptionnelle, suggérant un mécanisme par lequel les séquences bordant la boîte TATA et l'I_{nr} influencent la transcription. Il serait maintenant intéressant d'étudier l'effet de la topologie de l'ADN du promoteur sur la transcription par l'ARN pol II *in vivo*. En effet, la topologie de l'ADN pourrait dicter non seulement la force transcriptionnelle, mais aussi la localisation des nucléosomes.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMCZEWSKI, J.P., M. ROSSIGNOL, J.P. TASSAN, E.A. NIGG, V. MONCOLLIN et J.-M. EGLY. 1996. MAT1, cdk7 and cyclin H form a kinase complex which is UV light-sensitive upon association with TFIID. *EMBO J.* 15: 1877-1884.

AKOULITCHEV, S., S. CHULKOV et D. REINBERG. 2000. TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* 407: 102-106.

AMANO, N., Y. OHFUKU et M. Suzuki. 1997. Genomes and DNA conformation. *Biol. Chem.* 378: 1397-1404.

ANDEL III, F., A.G. LADURNER, C. INOUE, R. TJIAN et E. NOGALES. 1999. Three-dimensional structure of the human TFIID-IIA-IIB complex. *Science* 286: 2153-2155.

ARANDA, A. et N.J. PROUDFOOT. 1999. Definition of transcriptional pause element in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1251-1261.

ARNOTT, S., R. CHANDRASEKARAN, L.C. PUIGJANER, J.K. WALKER, I.H. HALL, D.L. BIRDSALL et R.L. RATLIFF. 1983. Wrinkled DNA. *Nucleic Acids Res.* 11: 1457-74.

ASAYAMA, M., Y. HAYASAKA, M. KABASAWA, M. SHIRAI et T. OHYAMA. 1999. An intrinsic DNA curvature found in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* K-81 affects the promoter activity of *rpoD1* encoding a principal sigma factor. *J. Biochem.* 125: 460-468.

ASO, T., J.W. CONAWAY et R.C. CONAWAY. 1994. Role of core promoter structure in assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. *J. Biol. Chem.* 269: 26575-26583.

ASTURIAS, F.J., G.D. MEREDITH, C.L. POGLITSH et R.D. KORNBERG. 1997. Two conformations of RNA polymerase II revealed by electron crystallography. *J. Mol. Biol.* 272: 536-540.

ASTURIAS, F.J. et R.D. KORNBERG. 1999. Protein crystallization on lipid layers and structure determination of the RNA polymerase II transcription initiation complex. *J. Biol. Chem.* 274: 6813-6816.

AUBLE, D.T. et S. HAHN. 1993. An ATP-dependent inhibitor of TBP binding to DNA. *Genes and Dev.* 7: 844-856.

AWREY, D.E., R.G. WEILBAECHER, S.A. HEMMING, S.M. ORLICKY, C.M. KANE et A.M. EDWARDS. 1997. Transcription elongation through DNA arrest sites. A multistep process involving both RNA polymerase II subunit RPB9 and TFIIS. *J. Mol. Biol.* 272: 14747-14754.

BALCIUNAS, D., C. GÄLMAN, H. RONNE et S. BJÖRKLUND. 1999. The Med1 subunit of the yeast mediator complex is involved in both transcriptional activation and repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 376-381.

BANGUR, C.S., S.L. FAITAR, J.P. FOLSTER et A.S. PONTICELLI. 1999. An interaction between the N-terminal region and the core domain of yeast TFIIB promotes the formation of TATA-binding protein-TFIIB-DNA complexes. *J. Biol. Chem.* 274: 23203-23209.

BARBERIS, A. C.W. MULLER, S.C. HARRISON et M. PTASHNE. 1993. Delineation of two functional regions of transcription factor TFIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5628-5632.

BARBERIS, A. et L. GAUDREAU. 1998. Recruitment of the RNA polymerase II holoenzyme and its implications in gene regulation. *Biol. Chem.* 379: 1397-1405.

BJÖRKLUND, S. et Y.-J. KIM. 1996. Mediator of transcriptional regulation. *Trends in Biochemical Sciences* 21: 335-7.

BOLSHOY, A., P. McNAMARA, R.E. HARRINGTON et E.N. TRIFONOV. 1991. Curved DNA without A-A: experimental estimation of all 16 DNA wedge angles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2312-2316.

BRACCO, L., D. KOTLARZ, A. KOLB, S. DIEKMANN et H. BUC. 1989. Synthetic curved DNA sequences can act as transcriptional activators in *Escherichia coli*. EMBO J. 8: 4289-4296.

BRADSHER, J.N., K.W. JACKSON, R.C. CONAWAY et J.W. CONAWAY. 1993a. Identification, purification, and properties. J. Biol. Chem. 268: 25587-25593.

BRADSHER, J.N., S. TAN, H.-J. McLAURY, J.W. CONAWAY et R.C. CONAWAY. 1993b. Functional properties and role in RNA chain elongation. J. Biol. Chem. 268: 25594-25603.

BRADSHER, J., F. COIN et J.-M. EGLY. 2000. Distinct roles for the helicases of TFIIF in transcript initiation and promoter escape. J. Biol. Chem. 275: 2532-2538.

BROWN, C.E., T. LECHNER, L. HOWE et J.L. WORKMAN. 2000. The many HATs of transcription coactivators. Trends in Biochemical Sciences 25: 15-19.

BRUKNER, I., M. DLAKIE, A. SAVIC, S. SUSIC, S. PONGOR et D. SUCK. 1993. Evidence for opposite groove-directed curvature of GGGCCC and AAAAA sequence elements. Nucleic Acids Res. 21: 1025-1029.

BUERMEYER, A.B., L.A. STRASHEIM, S.L. McMAHON et P.J. FARNHAM. 1995. Identification of *cis*-acting elements that can obviate a requirement for the C-terminal domain of RNA polymerase II. J. Biol. Chem. 270: 6798-6807.

BURKE, T.W. et J.T. KADONAGA. 1997. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAF_{II}60 of *Drosophila*. Genes Dev. 11: 3020-3031.

BURTON, Z.F., M. KILLEEN, M. SOPTA, L.G. ORTOLAN et J. GREENBLATT. 1988. RAP30/74: a general initiation factor that binds to RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 8: 1602-1613.

BUSSO, D., A. KERIEL, B., SANDROCK, A. POTERSZMAN, O. GILEADI et J.-M. EGLY. 2000. Distinct regions of MAT1 regulate cdk7 kinase and TFIIF transcription activities. *J. Biol. Chem.* 275: 22815-22823.

CHABOT, B., S. BISOTTO et M. VINCENT. 1995. The nuclear matrix phosphoprotein p255 associates with splicing complexes as part of the (U4/U6.U5) tri-snRNP particle. *Nucleic Acids Res.* 23: 3206-3213.

CHALKLEY, G.E. et C.P. VERRIJZER. 1999. DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF_{II}250-TAF_{II}150 complex recognizes the initiator. *EMBO J.* 18: 4835-4845.

CHAMBERS, R.S., B.Q. WANG, Z.F. BURTON et M.E. DAHMUS. 1995. The activity of COOH-terminal domain phosphatase is regulated by a docking site on RNA polymerase II and by the general transcription factors IIF and IIB. *J. Biol. Chem.* 270: 14962-14969.

CHEN, S., R.W. Jr. WEST, S.L. JOHNSON, H. GANS, B. KRUGER, et J. MA. 1993. TSF3, a global regulatory protein that silences transcription of yeast GAL genes, also mediates repression by alpha 2 repressor and is identical to SIN4. *Mol. Cell. Biol.* 13: 831-840.

CHEN, J.L., L.D. ATTARDI, C.P. VERRIJZER, K. YOKOMORI et R. TJIAN. 1994. Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirement for distinct transcriptional activators. *Cell* 79: 93-105.

CHO, E.J., T. TAKAGI, C.R. MOORE et S. BURATOWSKI. 1997. mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 11: 3319-3326.

COLEMAN, R.A., A.K.P. TAGGART, L.R. BENJAMIN et B.F. PUGH. 1995. Dimerization of the TATA binding protein. *J. Biol. Chem.* 270: 13842-13849.

CONAWAY, J.W., A. SHILATIFARD, A. DVIR et R. CONAWAY. 2000. Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends in Biol. Sci.* 25: 375-380.

CORTES, P., O. FLORES et D. REINBERG. 1992. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification and analysis of transcription factor IIA and identification of transcription factor TFIIJ. *Mol. Cell. Biol.* 12: 413-421.

COULOMBE, B., A. PONTON, R.S. KERBEL et D. SKUP. 1992. Structure and function of murine TIMP gene. *Matrix Supplement 1*: 269-274.

COULOMBE, B. et Z.F. BURTON. 1999. DNA bending and wrapping around RNA polymerase: a "revolutionary" model describing transcriptional mechanisms. *Micro. Mol. Biol. Rev.* 63: 457-478.

COX, J.M., M.M. HAYWARD, J.F. SANCHEZ, L.D. GEGNAS, S. van der ZEE, J.H. DENNIS, P.B. SIGLER et A. SCHEPARTZ. 1997. Bidirectional binding of the TATA box binding protein to the TATA box. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 13475-13480.

COX, J.M., A.R. KAYS, P.B. SANCHEZ et A. SCHEPARTZ. 1998. Preinitiation complex assembly: potentially a bumpy path. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 11-17.

CRAMER, P., D.A. BUSHNELL, J. FU, A.L. GNATT, B. MAIER-DAVIS, N.E. THOMPSON, R.R. BURGESS, A.M. EDWARDS, P.R. DAVID et R.D. KORNBERG. 2000. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* 288: 640-649.

DAHMUS, M.E. 1996. Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 271: 19009-19012.

DAUGHERTY, M.A., M. BRENOWITZ et M.G. FRIED. 1999. The TATA-binding protein from *Saccharomyces cerevisiae* oligomerizes in solution at micromolar concentrations to forms tetramers and octamers. *J. Mol. Biol.* 285: 1389-1399.

DAVIS, N.A., S.S. MAJEE et J.D. KAHN. 1999. TATA box DNA deformation with and without the TATA box-binding protein. *J. Mol. Biol.* 291: 249-265.

deLAAT, W.L., N.G.J. JASPERS et J.H.J. HOEIJMAKERS. 1999. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 13: 768-785.

de SOUZA, O.N. et R.L. ORNSTEIN. 1998. Inherent DNA curvature and flexibility correlate with TATA box functionality. *Biopoly.* 46: 403-415.

DICKERSON, R.E., M. BANSAL, C.R. CALLADINE, S. DIEKMANN, W.N. HUNTER, O. KENNARD, E. von KITZING, R. LAVERY, H.C.M. NELSON, W.K. OLSON, W. SAENGER, Z. SHAKKED, H. SKLENAR, D.M. SOUMPASIS, C.-S. TUNG, A.H.-J. WANG et V.B. ZHURKIN. 1989. Definitions and nomenclature of nucleic acid structure parameters. *EMBO J.* 8: 1-4.

DICKERSON, R.E. 1998. DNA bending: the prevalence of kinkiness and the virtues of normality. *Nucleic Acids Res.* 26: 1906-1926.

DIKSTEIN, R., S. RUPPERT et R. TJIAN. 1996. TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the base transcription factor RAP74. *Cell* 84: 781-790.

DOUZIECH, M., F. COIN, J.-M. CHIPOULET, Y. ARAI, Y. OHKUMA, J.-M. EGLY et B. COULOMBE. 2000. Mechanism of promoter melting by the Xeroderma pigmentosum complementation group B helicase of transcription factor IIH revealed by protein-DNA photo-Cross-linking. *Mol. Cell. Biol.* 20: 8168-8177.

DRAPKIN, R. et D. REINBERG. 1994. The multifunctional TFIIF complex and transcriptional control. *Trends Biochem. Sci.* 19: 504-508.

DVIR, A., K.P. GARRETT, C. CHALUT, J.-M. EGLY, J.W. CONAWAY et R.C. CONAWAY. 1996. A role for ATP and TFIIF in activation of the RNA polymerase II preinitiation complex prior to transcription initiation. *J. Biol. Chem.* 271: 7245-7248.

DVIR, A., R.C. CONAWAY et J.W. CONAWAY. 1997a. A role for TFIIH in controlling the activity of early RNA polymerase II elongation complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9006-9010.

DVIR, A., S. TAN, J.W. CONAWAY et R.C. CONAWAY. 1997b. Promoter escape by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 272: 28175-28178.

DVIR, A., J.W. CONAWAY et R.C. CONAWAY. 2000. The RNA polymerase II basal transcriptional machinery. *Curr. Opinion (sous presse)*

EDWARDS, A.M., C.M. KANE, R.A. YOUNG et R.D. KORNBERG. 1991. Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. *J. Biol. Chem.* 266: 71-75.

EL HASSAN, M.A. et C.R. CALLADINE. 1996. Propeller-twisting of base-pairs and the conformational mobility of dinucleotide steps in DNA. *J. Mol. Biol.* 259: 95-103.

FANG, S.M., et Z.F. BURTON. 1996. RNA polymerase II-associated protein (RAP) 74 binds transcription factor (TF) IIB and blocks TFIIB-RAP30 binding. *J. Biol. Chem.* 271: 11703-11709.

FEAVER, W.J., O. GILEADI, Y. LI et R.D. KORNBERG. 1991. CTD kinase associated with yeast RNA polymerase II initiation factor b. *Cell* 67: 1223-1230.

FEAVER, W.J., J.Q. SVEJSTRUP, N.L. HENRY et R.D. KORNBERG. 1994. Relationship of cdk-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIH/TFIIK. *Cell* 79: 1103-1109.

FLANAGAN, P.M., R.J. 3d KELLEHER, M.H. SAYRE, H. TSCHOCHNER et R.D. KORNBERG. 1991. A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature* 350: 436-438.

FLORES, O., E. MALDONADO et D. REINBERG. 1989. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Factors IIE and IIF independently interact with RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 264: 8913-8921.

FORGET, D., F. ROBERT, G. GRONDIN, Z.F. BURTON, J. GREENBLATT et B. COULOMBE. 1997. RAP74 induces promoter contacts by RNA polymerase II upstream and downstream of a DNA bend centered on the TATA box. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7150-7155.

FURTER-GRAVES, E.M., B.D. HALL et R. FURTER. 1994. Role of a small RNA pol II subunit in TATA to transcription start site spacing. *Nucleic Acid. Res.* 22: 4932-4936.

GAAL, T., L. RAO, S.T. ESTREM, J. YANG, R.M. WARTELL et R.L. GOURSE. 1994. Localization of the intrinsically bent DNA region upstream of the *E. coli rrnB* P1 promoter. *Nucleic Acids Res.* 22: 2344-2350.

GAISER, F., S. TAN et T.J. RICHMOND. 2000. Novel dimerization fold of RAP30/RAP74 in human TFIIF at 1,7Å resolution. *J. Mol. Biol.* 302: 1119-1127.

GARTENBERG, M.R. et D.M. CROTHERS. 1991. Synthetic DNA bending sequences increase the rate of in vitro transcription initiation at the *Escherichia coli* lac promoter. *J. Mol. Biol.* 219: 217-230.

GREENBLATT, J. 1997. RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr. Op. Cell Biol.* 9: 310-319.

GROVE, A., A. GALEONE, E. YU, L. MAYOL et E.P. GEIDUSCHEK. 1998. Affinity, stability and polarity of binding of the TATA binding protein governed by flexure at the TATA box. *J. Mol. Biol.* 282: 731-739.

HA, I., S. ROBERTS, E. MALDONADO, X. SUN, L.-U. KIM, M. GREEN et D. REINBERG. 1993. Multiple functional domains of human transcription factor IIB: distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. *Genes Dev.* 7: 1021-1032.

HAGERMAN, P.J. 1984. Evidence for the existence of stable curvature of DNA in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4632-4636.

HAGERMAN, P.J. 1985. Sequence dependence of the curvature of DNA: a test of the phasing hypothesis. *Biochemistry* 24: 7033-7037.

HAGERMAN, P.J. 1990. Sequence-directed curvature of DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 755-781.

HAHN, S. 1998. The role of TAFs in RNA polymerase II transcription. *Cell* 95: 579-582.

HAMPSEY, M. 1998. Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Micro. Mol. Biol. Rev.* 62: 465-503.

HAN, S.J., Y.C. LEE, B.S. GIM, G.-H. RYU, S.J. PARK, W.S. LANE et Y.-J. KIM. 1999. Activator-specific requirement of yeast mediator proteins for RNA polymerase II transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 19: 979-988.

HAWKES, N.A. et S.G.E ROBERTS. 1999. The role of human TFIIB in transcription start site selection *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 274: 14337-14343.

HEMMING, S.A. et A.M. EDWARDS. 2000. Yeast RNA polymerase II subunit RPB9. *J. Biol. Chem.* 275: 2288-2294.

HENGARTNER, C.J., C.M. THOMPSON, J. ZHANG, D.M. CHAO, S.-M. LIAA, A.J. KOLESKE, S. OKUMARA et R.A. YOUNG. 1995. Association of an activator with RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev.* 9: 897-910.

HIROSE, Y., R. TACKE et J.L. MANLEY. 1999. Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* 13: 1234-1239.

HISATAKE, K., R.G. ROEDER et M. HORIKOSHI. 1993. Functional dissection of TFIIB domains required for TFIIB-TFIID-promoter complex formation and basal transcription activity. *Nature* 363: 744-747.

HOLSTEGE, F.C.P., D. TANTIN, M. CAREY, P.C. van der VLIET et H.Th.M. TIMMERS. 1995. The requirement for the basal transcription factor IIE is determined by the helical stability of promoter DNA. *EMBO J.* 14: 810-819.

HOLSTEGE, F.C.P., P.C. van der VLIET et H.Th.M. TIMMERS. 1996. Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J.* 15: 1666-1677.

HOOPEs, B.C., J.F. LeBLANC et D.K. HAWLEY. 1992. Kinetic analysis of yeast TFIID-TATA box complex formation suggests a multi-step pathway. *J. Biol. Chem.* 267: 11539-11547.

HULL, M.W., K. McKUNE et N.A. WOYCHIK. 1995. RNA polymerase II subunit RPB9 is required for accurate start site selection. *Genes Dev.* 9: 481-490.

IMBALZANO, A.N., K.S. ZARET et R.E. KINGSTON. 1994. Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *J. Biol. Chem.* 269: 8280-8286.

ISHIGURO, A., Y. NOGI, K. HISATAKE, M. MURAMATSU et A. ISHIHAMA. 2000. The Rpb6 subunit of fission yeast RNA polymerase II is a contact target of the transcription elongation factor TFIIS. *Mol. Cell. Biol.* 20: 1263-1270.

JENSEN, G.J., G. MEREDITH, D.A. BUSHNELL et R.D. KORNBERG. 1998. Structure of wild-type yeast RNA polymerase II and location of Rpb4 and Rpb7. *EMBO J.* 17: 2353-2358.

JONES, S., P. van HEYNINGEN, H.M. BERMAN et J.M. THORNTON. 1999. Protein-DNA interactions: a structural analysis. *J. Mol. Biol.* 287: 877-896.

JUO, Z.S., T.K. CHIU, P.M. LIEBERMAN, I. BAIKALOV, A.J. BERK et R.E. DICKERSON. 1996. How proteins recognize the TATA box. *J. Mol. Biol.* 261: 239-254.

KILLEEN, M., B. COULOMBE et J. GREENBLATT. 1992. Recombinant TBP, transcription factor IIB, and RAP30 are sufficient for promoter recognition by mammalian RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 267: 9463-9466.

KIM, J.L., D.B. NIKOLOV et S.K. BURLEY. 1993. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature* 365: 520-527.

KIM, Y., J.H. GEIGER, S. HAHN et P.B. SIGLER. 1993. Crystal structure of yeast TBP/TATA-box complex. *Nature* 365: 512-520.

KIM, Y.-J., S. BJÖRKLUND, Y. LI, M.H. SAYRE et R.D. KORNBERG. 1994. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77: 599-608.

KITAJIMA, S., T. CHIBAZAKURA, M. YONAHARA et Y. YASUKOCHI. 1994. Regulation of the human general transcription initiation factor TFIIF by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269: 29970-29977.

KOLESKE, A.J. et R.A. YOUNG. 1994. An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368: 466-469.

KOLESKE, A.J. et R.A. YOUNG. 1995. The RNA polymerase II holoenzyme and its implication for gene regulation. *Trends Biochem. Sci.* 20: 113-116.

KOŁODZIEJ, P.A. et R.A. YOUNG. 1991. Mutations in the three largest subunits of yeast RNA polymerase II that affect enzyme assembly. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4669-4678.

KOO, H-S., H.-M. WU et D.M. CROTHERS. 1986. DNA bending at adenine•thymine tracts. *Nature* 320: 501-506.

KORNBERG, R.D. 1999. Eukaryotic transcriptional control. Trends Cell. Biol. 9: M46-49

KULDELL, N.H. et S. BURATOWSKI. 1997. Genetic analysis of the large subunit of yeast transcription factor IIE reveals two regions with distinct functions. Mol. Cell. Biol. 17: 5288-5298.

KUNKEL, G.R. et H.G. MARTINSON. 1981. Nucleosomes will not form on double-stranded RNA or over poly(dA)•poly(dT) tracts in recombinant DNA. Nucleic Acids Res. 9: 6869-6888.

KUTACH, A.K., et J.T. KADONAGA. 2000. The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. Mol. Cell. Biol. 20: 4754-4764.

LAGRANGE, T., t.k. kim, g. orphanides, y.w. ebright, r.h. ebright, ET d. reinberg. 1996. High-resolution mapping of nucleotide complexes by site-specific protein-DNA photocrosslinking: organization of the human TBP-TFIIA-TFIIB-DNA quaternary complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10620-10625.

LAGRANGE, T., A.N. KAPANIDIS, H. TANG, D. REINBERG et R.H. EBRIGHT. 1998. New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor TFIIB. Genes Dev. 12: 34-44.

LANDICK, R. 2000. Shifting RNA polymerase into overdrive. Science 284: 598-599.

LANE, D., P. PRENTKI et M. CHANDLER. 1992. Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. Micro. Rev. 56: 509-528.

LEE, T.I. et R.A. YOUNG. 1998. Regulation of gene expression by TBP-associated proteins. Genes Dev. 12: 1398-1408.

LEI, L., D. REN, A. FINKELSTEIN et Z.F. BURTON. 1998. Functions of the N- and C-terminal domains of human RAP74 in transcriptional initiation, elongation, and recycling of RNA polymerase II. Mol. Cell. Biol. 18: 2130-2142.

LEUTHER, K.K., D.A. BUSHNELL et R.D. KORNBERG. 1996. Two-dimensional crystallography of TFIIB- and IIE-RNA polymerase II complexes: implications for start site selection and initiation complex formation. *Cell* 85: 773-779.

LI, Y. et R.D. KORNBERG. 1994. Interplay of positive and negative effectors in function of the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2362-2366.

LI, Y., P.M. FLANAGAN, H. TSCHOCHNER, et R.D. KORNBERG. 1994. RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* 263: 805-807.

LI, Y., S. BJÖRKLUND, Y.-W. JIANG, Y.-J. KIM, W.S. LANE, D.J. STILLMAN et R.D. KORNBERG. 1995. Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex/RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10864-10868.

LIEBERMAN, P.M., M.C. SCHMIDT, C.C. KAO et A.J. BERK. 1991. Two distinct domains in the yeast transcription factor IID and evidence for a TATA box-induced conformational change. *Mol. Cell. Biol.* 11: 63-74.

LIEBERMAN, P.M. et A.J. BERK. 1994. A mechanism for TAFs in transcriptional activation: activation domain enhancement of TFIID-TFIIA-promoter DNA complex formation. *Genes Dev.* 8: 995-1006.

LILLEY, D. 1986. Bent molecules-how and why? *Nature* 320: 487-488.

LIN, Y.S., I. HA, E. MALDONADO, D. REINBERG et M.R. GREEN. 1991. Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating regions. *Nature* 353: 569-571.

LIN, Y.S. et M.R. GREEN. 1991. Mechansim of action of an acidic transcriptional activator in vitro. *Cell* 64: 971-981.

LITTLEFIELD, O., Y. KORKHIN et P.B. SIGLER. 1999. The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 13668-13673.

LIU, D., R. ISHIMA, K.I. TONG, S. BAGBY, T. KOKUBO, D.R. MUHANDIRAM, L.E. KAY, Y. NAKATANI et M. IKURA. 1998. Solution structure of a TBP-TAF_{II}230 complex: protein mimicry of the minor groove surface of the TATA box unwound by TBP. *Cell* 94: 573-583.

LIU, Q., S.E. GABRIEL, K.L. ROINICK, R.D. WARD et K.M. ARNDT. 1999. Analysis of TFIIA function in vivo: evidence for a role in TATA-binding protein recruitment and gene-specific activation. *Mol. Cell. Biol.* 19: 8673-8685.

LORCH, Y., J. BEVE, C.M. GUSTAFSSON, L.C. MYERS et R.D. KORNBERG. 2000. Mediator-nucleosome interaction. *Mol. Cell.* 6: 197-201.

LU, H., O. FLORES, R. WEINMANN, et D. REINBERG. 1991. The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proc. Natl. Sci USA* 88: 10004-10008.

LU, H., L. ZAWEL, L. FISHER, J.-M. EGLY et D. REINBERG. 1992. Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* 358: 641-645.

MAKELA, T.P., J.D. PARVIN, J. KIM, L.J. HUBER, P.A. SHARP et R.A. WEINBERG. 1995. A kinase-deficient transcription factor TFIIH is functional in basal and activated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5174-5178.

MALIK, S. D.K. LEE et R.G. ROEDER. 1993. Potential RNA polymerase II-induced interactions of transcription factor TFIIB. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6253-6259.

MARINI, J.C., S.D. LEVENE, D.M. CROTHERS et P.T. EMGLUND. 1982. Bent helical structure in kinetoplast DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7664-7668.

MARINI, J.C., P.N. EFFRON, T.C. GOODMAN, C.K. SINGLETON, R.D. WELLS, R.M. WARTELL et P.T. ENGLUND. 1984. Physical characterization of a kinetoplast DNA fragment with unusual properties. *J. Biol. Chem.* 259: 8974-8979.

MARSHALL, N.F., J. PENG, Z. XIE et D.H. PRICE. 1996. Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxy-terminal domain kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 27176-27183.

MAXON, M.E., J.A. GOODRICH et R. TJIAN. 1994. Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIH: a model for promoter clearance. *Genes Dev.* 8: 515-524.

McCRACKEN, S., N. FONG, E. ROSONINA, K. YANKULOV, G. BROTHERS, D. SIDEROVSKI, A. HESSEL, S. FOSTER, AMGEN EST PROGRAM, S. SHUMAN et D.L. BENTLEY. 1997a. 5'-capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes and Dev.* 11: 3306-3318.

McCRACKEN, S., N. FONG, K. YANKULOV, S. BALLANTYNE, G. PAN, J. GREENBLATT, S.D. PATTERSON, M. WICKENS et D.L. BENTLEY. 1997b. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385: 357-361.

McKUNE, K., P.A. MOORE, M.W. HULL et N.A. WOYCHIK. 1995. Six human RNA polymerase subunit functionally substitute for their yeast counterparts. *Mol. Cel. Biol.* 15: 6895-6900.

McNAMARA, P.T. et R.E. HARRINGTON. 1991. Characterization of inherent curvature in DNA lacking polyadenine runs. *J. Biol. Chem.* 266: 12548-12554.

MICHEL, B., P. KOMARNITSKI et S. BURATOWSKI. 1998. Histone-like TAFs are essential for transcription in vivo. *Mol. Cell.* 2: 663-673.

MITCHELL, P.J., R. TJIAN. 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-378.

MIZZEN, C.A., X.-J. YANG, T. KOKUBO, J.E. BROWNELL, A.J. BANNISTER, T. OWEN-HUGHES, J. WORKMAN, L. WANG, S.L. BERGER, T. KOUZARIDES, Y. NAKATANI et C.D. ALLIS. 1996. The TAF_{II}250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87: 1261-1270.

MOQTADERI, Z. Y. BAI, D. POON, P.A. WEIL et K. STRUHL. 1996. TBP-associated factors are not generally required for transcriptional activation in yeast. *Nature* 382: 188-191.

MORELAND, R.J., J.S. HANAS, J.W. CONAWAY et R.C. CONAWAY. 1998. Mechanism of action of RNA polymerase II elongation factor elongin. *J. Biol. Chem.* 273: 26610-26617.

MORELAND, R.J., F. TIRODE, Q. YAN, J.W. CONAWAY, J.-M. EGLY et R.C. CONAWAY. 1999. A role for the TFIIH XPB DNA helicase in promoter escape by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 274: 22127-22130.

MULDROW, T.A., A.M. CAMPBELL, P.A. WEIL et D.T. AUBLE. 1999. MOT1 can activate basal transcription in vitro by regulating the distribution of TATA binding protein between promoter and nonpromoter sites. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2835-2845.

MYERS, L.C., C.M. GUSTAFSSON, D.A. BUSHNELL, M. LUI, H. ERDJUMENT-BROMAGE, P. TEMPST et R.D. KORNBERG. 1998. The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 12:45-54.

MYERS, V.E. et R.A. YOUNG. 1998. RNA polymerase II holoenzymes and subcomplexes. *J. Biol. Chem.* 273: 27757-27760.

NAKATANI, Y., M. HORIKOSHI, M. BRENNER, T. YAMAMOTO, F. BESNARD, R.G. ROEDER et E. FREESE. 1990. A downstream initiation element required for efficient TATA box binding and in vitro function of TFIID. *Nature* 348: 86-88.

NELSON, H.C.M., J.T. FINCH, F.L. BONAVENTURA, L. KLUG et A. KLUG. 1987. The structure of an oligo(dA) • oligo(dT) tracts and its biological implications. *Nature* 330: 221-226.

NIKOLOV, D.B., H. CHEN, E.D. HALAY, A.A. USHEVA, K. HISATAKE, D.K. LEE, R.G. ROEDER et S.K. BURLEY. 1995. Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA element ternary complex. *Nature* 377: 119-128.

NONET, M., D. SWEETSER et R.A. YOUNG. 1987. Functional redundancy and structural polymorphism in the large subunit of RNA polymerase II. *Cell* 50: 909-915.

NONET, M.L. et R.A. YOUNG. 1989. Intragenic and extragenic suppressors of mutations in the heptapeptide repeat domain of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II. *Genetics* 123: 715-724.

OELGESCHLÄGER, T, C.M. CHIANG et R.G. ROEDER. 1996. Topology and reorganization of a human TFIID-promoter complex. *Nature* 382: 735-738.

OELGESCHLÄGER, T., Y. TAO, Y.K. KANG et R.G. ROEDER. 1998. Transcription activation via enhanced preinitiation complex assembly in a human cell-free system lacking TAF_{II}s. *Mol. Cell.* 1: 925-931.

OGBOURNE, S. et T.M. ANTALIS. 1998. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J.* 331: 1-14.

OHKUMA, Y. H. SUMIMOTO, M. HORIKOSHI et R.G. ROEDER. 1990. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification and characterization of general transcription factor TFIIE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8928-8935.

OHKUMA, Y., et R.G. ROEDER. 1994. Regulation of TFIIH ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation. *Nature* 368: 160-163.

OHKUMA, Y., HASHIMOTO, S., C.K. WANG, HORIKOSHI, M. et R.G. ROEDER. 1995. Analysis of the role of TFIIE in basal transcription and TFIIH-mediated carboxy-terminal domain phosphorylation through structure-function studies of TFIIE-alpha. *Mol. Cell. Biol.* 15: 4856-4866.

OKAMOTO, T., S. YAMAMOTO, Y. WATANABE, T. OHTA, F. HANAOKA, R.G. ROEDER et Y. OHKUMA. 1998. Analysis of the role of TFIIE in transcriptional regulation through structure-function studies of the TFIIE β subunit. *J. Biol. Chem.* 273: 19866-19876.

OKUDA, M., Y. WATANABE, H. OKAMURA, F. HANAOKA, Y. OHKUMA et Y. NISHIMURA. 2000. Structure of the central core domain of the TFIIE β with a novel double-stranded DNA-binding surface. *EMBO J.* 19: 1346-1356.

ORPHANIDES, G., T. LAGRANGE et D. REINBERG. 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10: 2657-2683.

OTERO, G., J. FELLOWS, Y. LI, T. de BIZEMONT, A.M.G. DIRAC, C.M. GUSTAFSSON, H. ERDJUMENT-BROMAGE, P. TEMPST et J.Q. SVEJSTRUP. 1999. Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol. Cell.* 3: 109-118.

PAN, G. et J. GREENBLATT. 1994. Initiation of transcription by RNA polymerase II is limited by melting of the promoter DNA in the region immediately upstream of the initiation site. *J. Biol. Chem.* 269: 30101-30104.

PETERSON, M.G., N. TANESE, B.F. PUGH et R. TJIAN. 1990. Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding. *Science* 248: 1625-1630.

PETERSON, M.G., J. INOSTROZA, M.E. MAXON, O. FLORES, A. ADMON, D. REINBERG et R. TJIAN. 1991. Structure and functional properties of human general transcription factor IIE. *Nature* 354: 369-373.

PINTO, I., W.H. WU, J.G. NA et M. HAMPSEY. 1994. Characterization of sua7 mutations defines a domain of TFIIB involved in transcription start site selection in yeast. *J. Biol. Chem.* 269: 30569-30573.

PLAKSON, R.R. et R.M. WARTELL. 1987. Sequence distributions associated with DNA curvature are found upstream of strong *E. coli* promoters. *Nucleic Acids Res.* 15: 785-796.

PRICE, D.H. 2000. P-TEFFb, a cyclin-dependent kinase controlling by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 20: 2629-2634.

PRUNELL, A. 1982. Nucleosome reconstitution on plasmid-inserted poly(dA)•poly(dT). *EMBO J.* 1: 173-179.

PTASHNE, M. 1988. How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335: 683-689.

RASMUSSEN, E.B. et J.T. LIS. 1995. Short transcript of the ternary complex provide insight into RNA polymerase II elongational pausing. *J. Mol. Biol.* 252: 522-535.

REEDER, T.C. et D.K. HAWLEY. 1996. Promoter proximal sequences modulate RNA polymerase II elongation by a novel mechanism. *Cell* 87: 767-777.

RHODES, D. 1979. Nucleosome cores reconstituted from poly (dA-dT) and the octamer of histones. *Nucleic Acids Res.* 6: 1805-1816.

ROBERT, F. D. FORGET, J. LI, J. GREENBLATT et B. COULOMBE. 1996. Localization of subunits of transcription factors IIE and IIF immediately upstream of the transcriptional initiation site of the adenovirus major late promoter. *J. Biol. Chem.* 271: 8517-8520.

ROBERT, F., M. DOUZIECH, D. FORGET, J.-M. EGLY, J. GREENBLATT, Z.F. BURTON et B. COULOMBE. 1998. Wrapping of promoter DNA around the RNA polymerase II initiation complex induced by TFIIF. *Mol. Cell.* 2: 341-351.

ROSSIGNOL, M., A. KERIEL, A. STAUB et J.-M. EGLY. 1999. Kinase activity and phosphorylation of the largest subunit of TFIIF transcription factor. *J. Biol. Chem.* 274: 22387-22392.

RUPPERT, S. et R. TJIAN. 1995. Human TAFII250 interacts with RAP74: implications for RNA polymerase II initiation. *Genes Dev.* 9: 2747-2755.

SARAI, A., J. MAZUR, R. NUSSINOV et R.L. JERNIGAN. 1989. Sequence dependence of DNA conformational flexibility. *Biochemistry* 28: 7842-7849.

SCHAEFFER, L., R. ROY, S. HUMBERT, V. MONCOLLIN, W. VERMEULEN, J.H.J. HOEIJMAKERS, P. CHAMBON et J.-M. EGLY. 1993. The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *Science* 260: 58-63.

SCHAEFFER, L., V. MONCOLLIN, R. ROY, A. STAUB, M. MEZZINA, A. SARASIN, G. WEEDA, J.H.J. HOEIJMAKERS et J.-M. EGLY. 1994. DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *EMBO J.* 13: 2388-2392.

SCHULTZ, P., S. FRIBOURG, A. POTERSZMAN, V. MALLOUH, D. MORAS et J.-M. EGLY. 2000. Molecular structure of human TFIIH. *Cell* 102: 599-607.

SERIZAWA, H., J.W. CONAWAY, et R.C. CONAWAY. 1994. An oligomeric form of the large subunit of transcription factor (TF) IIE activates phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by TFIIH. *J. Biol. Chem.* 269: 20750-20756.

SHEFFER, A, M. VARON et M. CHODER. 1999. Rpb7 can interact with RNA polymerase II and support transcription during some stress independently of Rpb4. *Mol. Cel. Biol.* 19: 2672-2680.

SIMPSON, R.T. et P. KUNZLER. 1979. Chromatin and core particles formed from the inner histones and synthetic polydeoxyribonucleotides of defined sequence. *Nucleic Acids Res.* 6: 1387-1415.

SINDEN, R.R. 1994. In *DNA structure and function*. Ch 2. Academic Press (éd.). Toronto, Canada.

SMALE, S.T., M.C. SCHMIDT, A.J. BERK et D. BALTIMORE. 1990. Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4509-4513.

SOLOW, S.P., L. LEZINA et P.M. LIEBERMAN. 1999. Phosphorylation of TFIIA stimulates TATA binding protein-TATA interaction and contributes to maximal transcription and viability in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2846-2852.

STARR, D.B., B.C. HOOPES et D.K. HAWLEY. 1995. DNA bending is a important component of site-specific recognition by the TATA binding protein. *J. Mol. Biol.* 250: 434-446.

STILLMAN, D.J., S. DORLAND et Y.YU. 1994. Epistasis analysis of suppressor mutations that allow HO expression in the absence of the yeast SW15 transcriptional activator. *Genetics* 136: 781-788.

STRAGELL, L.A. et K. STRUHL. 1995. The TBP-TFIIA interaction in the response to acidic activators in vivo. *Science* 269: 75-78.

STRUHL, K. et Z. MOQTADERI. 1998. The TAFs in the HAT. *Cell* 94: 1-4.

SUN, Z.-W., A. TESSMER et M. HAMPSEY. 1996. Functional interaction between TFIIB and the Rpb9 (Ssu73) subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acid. Res.* 24: 2560-2566.

SUZUKI, M., D. LOAKES et N. Yagi. 1996. DNA conformation and its changes upon binding transcription factors. *Adv. Biophys.* 32: 53-72.

TAN, S., T. ASO, R.C. CONAWAY et J.W. CONAWAY. 1994. Roles for both the RAP30 and RAP74 subunits of transcription factor IIF in transcription initiation and elongation by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 269: 25684-25691.

THOMPSON, C.M., A.J. KOLESKE, D.M. CHAO et R.A. YOUNG. 1993. A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell* 73: 1361-1375.

THOMPSON, C.M. et R.A. YOUNG. 1995. General requirement for RNA polymerase II holoenzymes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4587-4590.

TIJERINA, P. et M.H. SAYRE. 1998. A debilitating mutation in transcription factor IIE with differential effects on gene expression in yeast. *J. Biol. Chem.* 273: 1107-1113.

TIRODE, F., D. BUSSO, F. COIN et J.-M. EGLY. 1999. Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol. Cell.* 3: 87-95.

TRIFONOV, E.N. et J.L. SUSSMAN. 1980. The pitch of chromatin DNA is reflected in its nucleotide sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3816-3820.

TSAI, F.T.F., LITTLEFIELD, O., P.F. KOSA, J.M. COX, A. SCHEPARTZ et P.B. SIGLER. 1998. Polarity of transcription on pol II and archaeal promoters: where is the 'one-way sign' and how is it read? *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63: 53-61.

UDVARDY, A. 1999. Dividing the empire: boundary chromatin elements delimit the territory of enhancers. *EMBO J.* 18: 1-8.

Van VUUREN, A.J., W. VERMEULEN, L. MA, G. WEEDA, E. APPELDOORN, N.G.J JASPERS, A.J. van der EB, D. BOOTSMA, J.H.J HOEIJMAKERS, S. HUMBERT, L. SCHAEFFER et J.-M. EGLY. 1994. Correction of xeroderma pigmentosum repair defect by basal transcription factor BTF2 (TFIIH). *EMBO J.* 13: 1645-1653.

WILSON, C.J., D.M. CHAO, A.N. IMBALZANO, G.R. SCHNITZLER, R.E. KINGSTON et R.A. YOUNG. 1996. RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84: 235-244.

WINKLER, G.S., S.J. ARAUJO, U. FIEDLER, W. VERMEULEN, F. COIN, J.-M. EGLY, J.H.J. HOEIJMAKERS, R.D. WOOD, H.TH.M. TIMMERS et G. WEEDA. 2000. TFIIH with inactive XPD helicase functions in transcription initiation but is defective in DNA repair. *J. Biol. Chem.* 275: 4258-4266.

WOLNER, B.S. et J.D. GRALLA. 2000a. TATA-flanking sequences influence the rate and stability of TBP and TFIIB binding. *J. Biol. Chem.* published November 28, sous presse.

WOLNER, B.S. et J.D. GRALLA. 2000b. Roles for non-TATA core promoter sequences in transcription and factor binding. *Mol. Cell. Biol.* 20: 3608-3615.

WU, S.-Y., E. KERSHNAR et C.-M. CHIANG. 1998. TAF_{II}-independent activation mediated by human TBP in the presence of the positive cofactor PC4. *EMBO J.* 17: 4478-4490.

YAN, M. et J.D. GRALLA. 1997. Multiple ATP-dependent steps in RNA polymerase II promoter melting and initiation. *EMBO J.* 16: 7457-7467.

YAN, Q., R.J. MORELAND, J.W. CONAWAY et R.C. CONAWAY. 1999. Dual roles transcription factor IIF in promoter escape by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 274: 35668-35675.

YOKOMORI, K., C.P. VERRIJZER et R. TJIAN. 1998. An interplay between TATA box-binding protein and transcription factors IIE and IIA modulates DNA binding and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6722-6727.

YOUNG, R.A. 1991. RNA polymerase II. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 689-715.

ZAWEL, L. K.P., KUMAR et D. REINBERG. 1995. Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 9: 1479-1490.