



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*

Discipline ou spécialité : *Biologie Moléculaire et Cellulaire*

Présentée et soutenue par *Lisa MUNIZ*

Le 25 Mai 2012 à 14h

Titre : *Bases Moléculaires de l'assemblage de la snRNP 7SK séquestrant P-TEFb et de son désassemblage par la protéine Tat du VIH-1*

JURY

Pr. Pierre-Emmanuel GLEIZES : Président du Jury

Dr. Monsef BENKIRANE : Rapporteur

Dr. Anne-Catherine DOCK-BREGEON : Rapporteur

Dr. Arndt BENECKE : Examineur

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologies*

Unité de recherche : *Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote (LBME), CNRS UMR 5099*

Directeur(s) de Thèse : *Dr. Tamàs KISS*

Rapporteurs :

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres de mon jury : Anne-Catherine Dock-Bregeon, Monsef Benkirane, Arndt Benecke et Pierre-Emmanuel Gleizes pour avoir accepté de juger ce travail et pour avoir fait le déplacement pour assister à ma soutenance de thèse.

§§§

Un grand merci à Tamás pour m'avoir accueillie dans son équipe pour mon DEA. Merci de m'avoir permis de passer quatre ans et demi dans ton équipe. C'était un immense plaisir de travailler à tes côtés. Tu m'as tellement appris.

Merci Bea pour ta gentillesse et ton amitié. Merci de m'avoir appris tous tes petits trucs qui font toute la différence dans une manip.

Merci Bettina pour ta gentillesse et pour m'avoir poussée à faire du théâtre en DEA !! Ça m'a beaucoup aidée par la suite.

Merci Elodie pour m'avoir si bien encadrée pendant mon DEA et avoir pris sur ton temps pour corriger mon rapport alors que tu préparais ta thèse au même moment.

Merci Eléonore pour ta gentillesse et pour ton aide précieuse encore aujourd'hui pour la préparation de notre arrivée en Ecosse.

Merci à Natalia pour tous les bons moments passés au labo.

Un très grand merci à Sylvain... Merci pour ton aide précieuse sur mes deux projets et pour tes conseils judicieux dans tous les domaines ! Merci pour tous les bons moments passés au labo ou en dehors. Et merci d'avoir corrigé mon manuscrit.

Merci Patrice pour ta gentillesse, ta bonne humeur quotidienne et tes encouragements. Merci pour toutes les discussions entre enseignants au cours de la préparation des TD... Enfin, merci d'avoir participé à la correction de mon manuscrit.

Merci Coralie pour ta gentillesse, ton soutien et tous les bons conseils que tu as pu me donner. Merci pour tous les bons moments passés au labo ou en dehors. Enfin, merci d'avoir participé à la correction de ce manuscrit.

Merci Amandine pour ta gentillesse et ta bonne humeur communicative. Merci pour ton aide et ton soutien au cours de mes quatre ans et demi passés au labo.

Bon vent à Aline, à qui je souhaite de vivre dans cette équipe autant de bons moments que moi.

A tous les membres de l'équipe Kiss un grand MERCI pour ces moments merveilleux que nous avons passés ensemble. Ce fût un plaisir de travailler à vos côtés.

§§§

Merci Marie-Hélène pour m'avoir appris à enseigner. Merci pour tous vos conseils précieux.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble du LBME : merci aux « Cava » pour leurs sourires et leurs petits mots quotidiens, merci aux « Ferrer-Henry », merci aux « Gleizes », merci aux « Bystricky », merci aux « Gadal », merci aux « Cuvier » et enfin merci aux « Grigoriev ». C'est un grand plaisir de travailler dans ce laboratoire où tout le monde s'entraide volontiers dans la bonne humeur.

Enfin, merci à tous ceux qui font tourner le labo : l'accueil, le service Technik, la laverie. Et, un merci tout particulier à Safi et Cathy qui sont adorables et toujours prêtes à aider.

§§§

Un immense merci à Philippe et Christine pour m'avoir accueillie chez eux comme l'une de leurs filles et permis de réaliser mon stage de maîtrise dans d'excellentes conditions.

Merci à Catherine et Martine avec qui j'ai découvert le monde de la recherche et grâce à qui ma passion est née.

§§§

Pour finir, je souhaite remercier toute ma famille et tous mes amis.

Merci à mes parents et mon frère pour leur soutien sans faille et leur amour inconditionnel. Merci de m'avoir toujours encouragée à faire ce qui me passionne et de m'avoir permis de le faire dans les meilleures conditions qui soient.

A mes grands-parents, un immense merci pour votre accueil pendant mes cinq premières années d'étude. Merci pour votre soutien et vos encouragements.

Enfin, merci William pour ta confiance et ton soutien sans faille. Merci pour ton aide précieuse au quotidien et merci de m'avoir supportée dans les moments les plus difficiles. Sans toi ma vie n'aurait pas la même saveur.

§§§

AUTEUR : Lisa MUNIZ

TITRE : Bases moléculaires de l'assemblage de la snRNP 7SK séquestrant P-TEFb et de son désassemblage par la protéine Tat du VIH-1

DIRECTEUR DE THESE : Tamàs KISS

RESUME :

Le facteur positif d'élongation de la transcription P-TEFb est un facteur de transcription général, requis non seulement pour une expression efficace de la majorité des gènes codant des protéines, mais également pour la production de transcrits viraux pleine taille à partir du génome du VIH-1 intégré dans le génome de la cellule hôte. Composé de la kinase CDK9 et d'une cycline T associée, le complexe P-TEFb stimule l'élongation de la transcription en phosphorylant l'ARN polymérase II (ARN pol II), l'enzyme responsable de la synthèse de tous les ARN messagers de la cellule. L'activité du complexe P-TEFb est régulée négativement par sa séquestration réversible et dynamique au sein de la petite particule ribonucléoprotéique nucléaire 7SK (snRNP 7SK) par le petit ARN nucléaire 7SK (snARN 7SK), en coopération avec la protéine HEXIM. La snRNP 7SK contient également les protéines LARP7 et MePCE qui sont associées stablement au snARN 7SK et le stabilisent.

La transcription initiée à partir du promoteur LTR (Long Terminal Repeat) du génome du VIH-1 intégré est régulée principalement à l'étape d'élongation. La processivité de la transcription du génome viral dépend de la protéine virale Tat qui recrute P-TEFb au niveau de l'ARN pol II. En plus de son rôle dans le recrutement de P-TEFb, la protéine Tat entraîne le désassemblage de la snRNP 7SK pour augmenter le niveau de P-TEFb actif dans les cellules infectées. Mes travaux de thèse ont visé à mieux définir comment la snRNP 7SK est assemblée et comment la protéine Tat du VIH-1 est capable de la désassembler. Nous avons démontré que la structure en tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK contient deux motifs de liaison pour les protéines HEXIM ; *in vivo*, ces deux motifs recrutent deux protéines HEXIM de manière interdépendante. Nous avons ensuite montré que Tat et HEXIM se lient au snARN 7SK de manière mutuellement exclusive. Tat remplace efficacement HEXIM sur le snARN 7SK *in vivo* permettant ainsi le désassemblage de la snRNP 7SK/HEXIM/P-TEFb pour augmenter le niveau de P-TEFb actif. Enfin, nous avons identifié les éléments du snARN 7SK impliqués dans la liaison des protéines LARP7 et MePCE.

MOTS CLES : Elongation de la transcription, ARN polymérase II, snARN 7SK, ARN non codant.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Biologie-Santé-Biotechnologies

ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, CNRS UMR 5099
118 route de Narbonne,
31062 Toulouse cedex.

Abréviations

ADN : Acide DésoxyRiboNucléique
ARN : Acide RiboNucléique
ARNi : ARN interférence
ARNm : ARN messenger
ARNnc : ARN non codant
ARN pol I, ARN pol II, ARN pol III : ARN polymérase I, ARN polymérase II, ARN polymérase III
ATP : Adénosine Tri Phosphate
C. Elegans : *Caenorhabditis Elegans*
CAK : CDK-Activating Kinase1
CDK : Cyclin-Dependant Kinase
CTD : C-Terminal Domain
CycT1, CycT2 : Cycline T1, Cycline T2
D.Melanogaster : *Drosophila Melanogaster*
DHFR : DiHydroFolate Reductase
DRB : 5,6-dichloro-1-b-D-ribofuranosylbenzimidazole
DSIF : DRB-sensitivity-inducing factor
E.coli : *Escherichia coli*
H2A, H2B, H3, H4 : histone H2A, histone H2B, histone H3, histone H4
HEXIM : Hexamethylene bisacetamine-inducible protein 1
hnRNP : heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein
Hsp : Heat Shock Protein
kb : kilo paires de bases
kDa : kilo Dalton
LTR : Long Terminal Repeat
N-TEF : Negative Transcription Elongation Factor
ORF : Open Reading Frame ou cadre ouvert de lecture
PIC : PreInitiation complex
P-TEFb : Positive transcription elongation factor b
RNase : Ribonucléase
S.cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*
S. pombe : *Schizosaccharomyces pombe*
SINE : Short Interspersed Nuclear Elements
snRNP : small nuclear ribonucleoparticule
snARN : “small nuclear” ARN ou petit ARN nucléaire
TAF : TBP associated factor
TAR : Transactivating-responsive region
TBP : TATA box Binding Protein
TRM : Tat/TAR Recognition Motif
UV : ultraviolet
VIH : Virus de l’immunodéficience humaine

SOMMAIRE

SOMMAIRE	3
AVANT-PROPOS	6
<u>PARTIE I - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE-</u>	7
CHAPITRE I : LA TRANSCRIPTION PAR L'ARN POLYMERASE II	8
I) Les étapes majeures du cycle de transcription	8
I-1) L'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II	8
1- <i>Le passage à travers la barrière chromatinienne</i>	9
2- <i>La formation du complexe de pré-initiation</i>	9
I-2) Transition initiation-élongation	11
I-3) L'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II	12
1- <i>Les facteurs d'élongation</i>	13
2- <i>La pause transcriptionnelle imposée par les facteurs négatifs d'élongation de la transcription</i>	15
3- <i>L'élongation à travers les nucléosomes</i>	17
I-4) La terminaison de la transcription	19
1- <i>Terminaison dépendante du poly(A)</i>	20
2- <i>Terminaison dépendante de Sen1</i>	21
II) Le domaine Carboxy-terminal de l'ARN polymérase II	21
II-1) Phosphorylation/déphosphorylation de la Ser5 du CTD	22
1- <i>Kinases impliquées</i>	22
2- <i>Phosphatases impliquées</i>	23
3- <i>Rôle de cette modification</i>	23
II-2) Phosphorylation/déphosphorylation de la Ser2 du CTD	24
1- <i>Kinases impliquées</i>	24
2- <i>Phosphatases impliquées</i>	24
3- <i>Rôle de cette modification</i>	25
II-3) Rôles de la kinase CDK8	25
II-4) Rôle gène-spécifique de certaines modifications du CTD	25
III) Le couplage de la transcription avec la maturation des ARN	26
III-1) Ajout de la coiffe (ou « capping »)	26
III-2) Epissage	27
III-3) Maturation en 3'	28
CHAPITRE II : LES ARN NON CODANTS IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE LA	
TRANSCRIPTION	29
I- Les ARNnc ciblant directement l'ARN polymérase.....	29
I-1) L'ARN 6S chez les bactéries	29
I-2) L'ARN B2 chez la souris et les ARN Alu chez l'Homme	30

II- Les ARNnc ciblant des facteurs de transcription.....	31
II-1) Le snARN U1.....	32
II-2) Le snARN 7SK	32
II-3) L'ARN DHFR.....	32
III- Les ARN co-régulant la transcription.....	33
III-1) L'ARN SRA	33
III-2) L'ARN HSR1	34
IV- Les ARNnc facilitant les modifications de la chromatine.....	34
IV-1) L'ARN HOTAIR	34
IV-2) Les ARN Xist et Tsix	35
IV-3) Les ARN roX.....	36
CHAPITRE III : ROLE DES RNP 7SK DANS LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION.....	38
I) La RNP 7SK/HEXIM/P-TEFb.....	38
I-1) Le complexe P-TEFb	38
1- Les sous-unités du complexe P-TEFb	38
2- Régulation de l'activité de P-TEFb.....	39
3-Fonctions physiologiques.....	46
I-2) Le snARN 7SK.....	50
I-3) Les protéines HEXIM	52
I-4) La protéine LARP7	53
I-5) La protéine MePCE.....	54
II) Les différentes RNP 7SK.....	55
II-1) Les snRNP 7SK/hnRNP.....	56
II-2) Les nouveaux partenaires du snARN 7SK.....	56
CHAPITRE IV : PATHOLOGIES ASSOCIEES AU FACTEUR P-TEFB.....	58
CHAPITRE V : LA TRANSCRIPTION DU GENOME DU VIH-1.....	65
PRESENTATION DU SUJET.....	69
<u>PARTIE II -RESULTATS-</u>.....	70
CHAPITRE I : MECANISME UTILISE PAR LA PROTEINE TAT DU VIH-1 POUR LIBERER P-TEFB DE LA snRNP 7SK	71
I) Etat du domaine	71
II) Question posée et démarche expérimentale.....	71
III) Résultats	72
IV) Conclusion	73
CHAPITRE II : ANALYSE STRUCTURALE DES SITES DE LIAISON DES PROTEINES LARP7 ET MEPCE AU SNARN 7SK	74

I) Etat du domaine	74
II) Question posée et démarche expérimentale.....	74
III) Résultats	75
IV) Conclusion	81
V) Matériel et méthodes	81
V-1) Culture cellulaire.....	81
V-2) Immunoprécipitations.....	81
V-3) Analyse des ARN	81
<u>PARTIE III -DISCUSSION-</u>.....	83
CHAPITRE I : CONTROLE DE L'ACTIVITE CELLULAIRE DE P-TEFb PAR LA PROTEINE TAT DU VIH-1.....	84
I) Les éléments du snARN 7SK importants pour la liaison des protéines HEXIM.....	84
II) Libération de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK par la protéine virale Tat	85
CHAPITRE II : LES ELEMENTS DU SNARN 7SK IMPORTANTS POUR LA LIAISON DES PROTEINES LARP7 ET MEPCE	87
I) Formation de la snRNP « cœur » MePCE-LARP7-7SK	87
II) Recrutement de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK	89
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	91

AVANT-PROPOS

Toutes les cellules vivantes sur terre, sans aucune exception connue, conservent leurs informations héréditaires sous la forme d'une molécule d'ADN (ou Acide Désoxyribonucléique) double brin. Au sein de l'ADN, on appelle « gènes » les unités d'information qui gouvernent les caractères transmissibles à la descendance. L'ADN est transcrit en ARN (Acide Ribonucléique) messager qui est lui-même traduit en protéine, molécule effectrice des fonctions cellulaires. Ce dogme central de la biologie, « un gène donne une protéine », a longtemps constitué la base de la biologie moléculaire. Néanmoins, le séquençage et l'annotation des génomes eucaryotes a révélé que seulement 1,5% du génome humain code des protéines. Avec de si faibles capacités de production de protéines, il est difficile de concevoir comment les génomes des organismes complexes sont capables de réguler si finement l'expression de leurs gènes au cours du développement. En réalité, chez les organismes supérieurs, il existe des variations au dogme « un gène donne une protéine ». En effet, le répertoire de protéines exprimées peut être considérablement augmenté par des maturations post-transcriptionnelles des ARNm. L'épissage alternatif, par exemple, permet, à partir d'un même gène, de générer différentes protéines par combinaison des différents exons. Des mécanismes, comme l'édition des ARNm ou l'existence de plusieurs sites de polyadénylation, contribuent également à étendre la variété du protéome.

Et puis, récemment, de nombreuses études ont révélé que la quasi-totalité du génome est transcrite en ARN. Certains de ces ARN, synthétisés sans pour autant être traduits, qui ont donc été appelés « ARN non codants », sont stables, d'autres sont rapidement dégradés. Parmi les premiers, on trouve des ARN impliqués dans la régulation de nombreuses étapes du métabolisme cellulaire. Et l'on ignore la fonction de beaucoup d'autres. Les ARN non codants dont la fonction est connue participent, entre autres, à la synthèse et à la translocation des protéines, à la régulation de l'expression des gènes ou encore à la synthèse des extrémités des chromosomes eucaryotes. Même chez les bactéries qui possèdent pourtant un génome plus compact, des ARN non codants capables d'influencer l'expression génique ont été identifiés. L'ensemble de ces ARNnc participe grandement à la complexité des génomes et des organismes supérieurs.

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à un de ces ARN non codants, identifié dans les cellules des eucaryotes supérieurs au cours des années 1970, le snARN 7SK. Comme nous le verrons tout au long de ce manuscrit, ce petit ARN de seulement 331 nucléotides, peut influencer la transcription globale des ARN messagers cellulaires, en contrôlant spécifiquement l'activité du facteur de transcription P-TEFb.

PARTIE I
- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE-

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

Les génomes eucaryotes sont complexes (environ 30000 gènes chez l'Homme) et organisés en structures nucléoprotéiques compactes, la chromatine. Les différents types cellulaires d'un organisme pluricellulaire se différencient les uns des autres parce que l'expression de leurs gènes diffère. De plus, les cellules sont capables de modifier le patron d'expression de leurs gènes en réponse à des signaux extracellulaires. Il est donc essentiel de comprendre les mécanismes par lesquels l'expression de chaque gène est régulée individuellement car ils ont une très grande importance physiologique. Bien que toutes les étapes impliquées dans l'expression d'un gène puissent être régulées, pour la plupart des gènes, la synthèse de l'ARN est le point de contrôle le plus important.

Chez les eucaryotes, la transcription des gènes nucléaires est assurée par trois ARN polymérases (ARN pol) différentes, contrairement aux bactéries et aux archées qui ne possèdent qu'un seul type d'ARN polymérase. Ainsi, chez les eucaryotes, l'ARN pol I synthétise les ARN ribosomiques (ARNr) à l'exception de l'ARNr 5S, l'ARN pol II est responsable de la synthèse de la totalité des ARN messagers et de certains ARN non codants, enfin, l'ARN pol III synthétise les ARN de transfert, l'ARNr 5S ainsi que certains petits ARN non codants. Malgré le fait que les ARN pol I et III soient à l'origine de 80% de la synthèse des ARN dans les cellules en croissance, l'ARN pol II a fait l'objet d'une plus grande attention étant donné son rôle majeur dans la transcription des gènes codant des protéines. Aussi, nous allons nous intéresser plus particulièrement à cette ARN polymérase.

Le cycle de transcription par l'ARN pol II est un processus très complexe et très régulé. De nombreuses interactions moléculaires entre l'ARN pol II, la matrice ADN, l'ARN en synthèse et de multiples protéines régulatrices contrôlent l'activité transcriptionnelle au cours du cycle de transcription.

Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

Une régulation correcte de l'expression génique est essentielle pour la différenciation, le développement et la survie de toutes les cellules de tous les organismes. La transcription est la première et la plus régulée de toutes les étapes permettant l'expression génique chez les eucaryotes.

Le cycle de transcription par l'ARN pol II peut être divisé en trois étapes majeures : l'initiation -lorsque l'ARN pol II est recrutée au niveau du promoteur et qu'elle commence la synthèse de l'ARN-, l'élongation -durant laquelle l'ARN pol II allonge le transcrit ARN-, et la terminaison -au cours de laquelle l'ARN pol II et le transcrit se désengagent de la matrice ADN-. Chacune de ces étapes est la cible de facteurs et de mécanismes régulateurs.

1) Les étapes majeures du cycle de transcription

I-1) L'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II

D'une manière générale, l'activation des gènes dans les cellules eucaryotes (dans lesquelles la cible de la machinerie transcriptionnelle est la chromatine) débute par deux étapes majeures. Premièrement, la barrière engendrée par la présence de nucléosomes, qui constituent les unités de base de la chromatine, est levée grâce à l'action combinée d'un ensemble de co-facteurs qui induisent des changements locaux et transitoires de la structure chromatiniennne à proximité du promoteur. Dans un deuxième temps, le complexe de pré-initiation (PIC) constitué de l'ARN pol II et des facteurs généraux de transcription s'assemble et initie la transcription.

1- Le passage à travers la barrière chromatinienne

L'empaquetage de l'ADN génomique au sein des nucléosomes, les unités fondamentales de la chromatine, crée une barrière aux mécanismes nucléaires, tels que la transcription, en empêchant l'association de facteurs essentiels et de régulateurs gène-spécifiques au niveau de leurs séquences cibles sur les promoteurs. Les unités de base constituant la chromatine sont les nucléosomes, qui consistent en une séquence d'ADN génomique de 146 paires de bases enroulée autour de deux copies de chacune des protéines histone cœur H2A, H2B, H3 et H4 (Wolffe, 2001). Les régions d'ADN situées entre deux nucléosomes adjacents sont occupées par une protéine histone linker H1 (Aoyagi et al., 2005; Hayes and Hansen, 2001). L'association de l'histone H1 facilite la condensation de la chromatine en fibre de 30 nm qui à son tour s'organise en une architecture hautement ordonnée pour former les chromosomes (Tremethick, 2007; Wolffe, 1998).

La régulation transcriptionnelle passe donc par la mise en place d'un équilibre dynamique entre l'empaquetage des séquences régulatrices au sein de la chromatine et l'accès à ces séquences par les régulateurs transcriptionnels. L'accès est donc restreint par les nucléosomes, mais ceux-ci peuvent être repositionnés, éjectés ou modifiés par des enzymes connues sous le nom de complexes de remodelage ou de modification de la chromatine.

Deux classes majeures de complexes régulent l'accessibilité des facteurs de transcription à leurs séquences cibles. Ainsi, les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants peuvent déplacer les nucléosomes en altérant les contacts ADN-histones, ce qui expose des séquences ADN cibles des facteurs de transcription (Narlikar et al., 2002) ; tandis que les complexes de modification des histones peuvent reconfigurer la structure des nucléosomes en modifiant de façon covalente les queues des histones pour réduire les interactions ADN-protéines (Fischle et al., 2003; Kouzarides, 2007; Trotter and Archer, 2007).

SWI/SNF est un exemple de complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant qui augmente l'accessibilité des facteurs de transcription aux séquences régulatrices. Les enzymes de remodelage de la famille SWI/SNF peuvent soit faire glisser, soit éjecter les nucléosomes, et leur fonction est souvent corrélée avec une désorganisation des nucléosomes et une activation des promoteurs (Lorch et al., 1999; Narlikar et al., 2002; Saha et al., 2006). Chez la levure, le recrutement de SWI/SNF au niveau des promoteurs est assuré par des régulateurs gène-spécifiques. Chez l'Homme, SWI/SNF s'associe notamment avec le récepteur aux glucocorticoïdes *in vivo* et cette interaction est requise pour les changements hormono-dépendants de la structure chromatinienne entourant le site de liaison du récepteur (Fryer and Archer, 1998).

Parmi les modifications covalentes des histones, l'hyperacétylation des lysines des queues des histones cœur a été particulièrement étudiée. En effet, des études par immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont montré qu'une augmentation de l'acétylation des queues des histones au niveau des régions promotrices de gènes spécifiques corrèle avec une augmentation de l'expression génique (Kuo et al., 2000). Par ailleurs, des travaux récents suggèrent qu'au niveau de certains promoteurs, la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 stimule le recrutement du facteur général de transcription TFIID (Vermeulen et al., 2007).

2- La formation du complexe de pré-initiation

L'initiation de la transcription est une étape très régulée, impliquant l'intervention de nombreux facteurs généraux et gènes-spécifiques. Ce processus complexe comprend plusieurs étapes, qui impliquent le recrutement de l'ARN polymérase au niveau du promoteur, une dénaturation locale de l'ADN autour du site d'initiation de la transcription et la formation des premières liaisons phosphodiester de l'ARN.

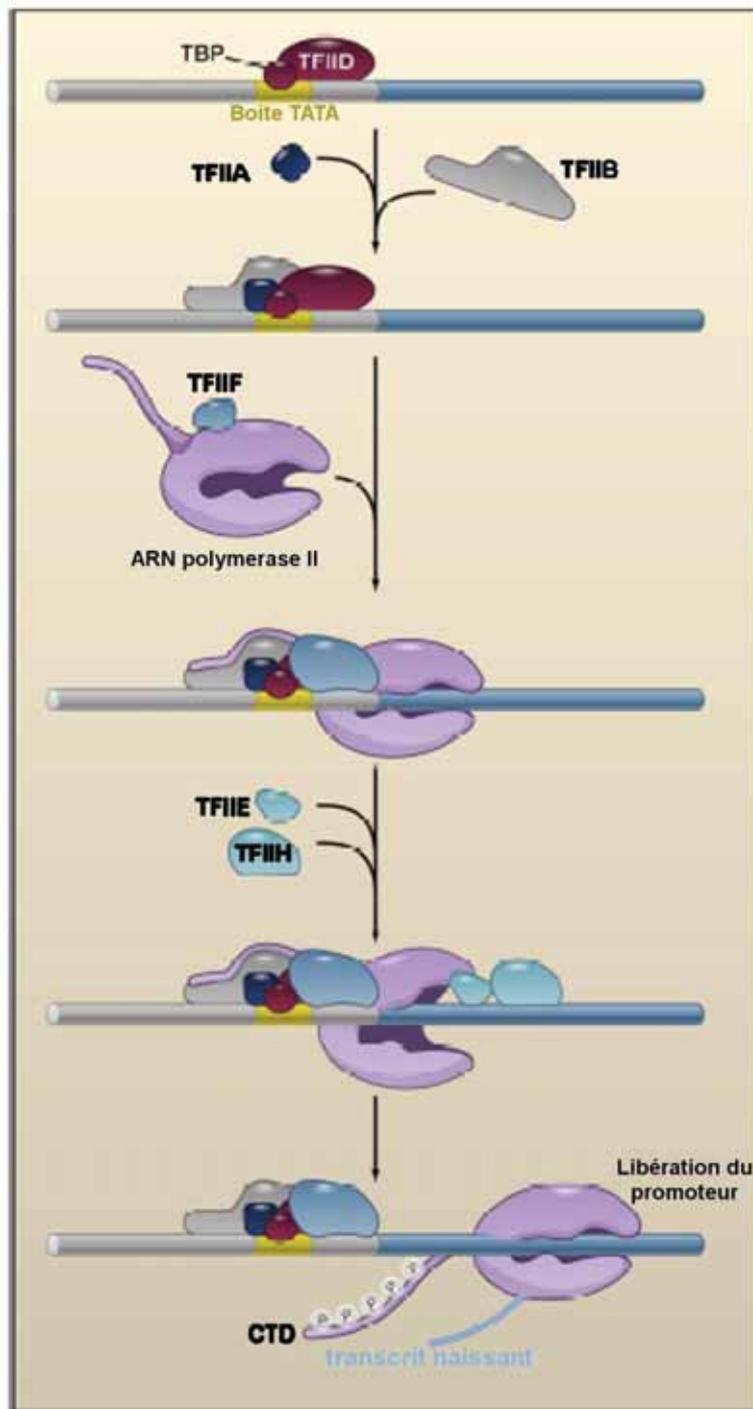


Figure 1 : Les étapes de l'initiation de la transcription (tiré de Levine, 2011)

Dans le cas des promoteurs contenant une boîte TATA, l'assemblage du complexe de pré-initiation (PIC) est initiée par la liaison de la sous-unité TBP (TATA binding protein) du complexe TFIID à la boîte TATA. Cette liaison stabilisée par TFIIA aide au recrutement de TFIIB. TFIIB définit le site d'initiation de la transcription et favorise le recrutement de l'ARN pol II et de TFIIF. Le complexe ainsi formé est initialement instable étant donné que le promoteur se trouve dans une conformation « fermée » en double hélice. Le recrutement de TFIIE et TFIIH entraîne la formation du complexe « ouvert ». L'ARN pol II peut alors accéder au brin matrice et initier la synthèse de l'ARN au niveau du point +1 d'initiation de la transcription. La libération du promoteur nécessite la phosphorylation de la sérine 5 du domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARN pol II.

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -

Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

La reconnaissance des promoteurs commence par l'assemblage d'un complexe macromoléculaire connu sous le nom de complexe de pré-initiation, ou PIC. Le PIC est constitué de multiples complexes protéiques et fait approximativement 3,5 MDa. L'ensemble des facteurs requis pour la formation de ce PIC inclut l'ARN pol II, et les facteurs généraux de transcription TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH. La formation du PIC peut être régulée par des facteurs de transcription gène-spécifiques, qui se lient à proximité du site d'initiation de la transcription. Ces facteurs peuvent agir indirectement sur la machinerie transcriptionnelle en recrutant des facteurs capables de modifier la chromatine (et donc de rendre l'ADN plus accessible), ou directement en interagissant avec des composants de la machinerie générale de transcription. De nombreuses études ont permis d'établir la succession d'étapes nécessaires à la formation du PIC (figure 1).

Les promoteurs minimaux sont classés en deux types principaux sur la base de la présence ou de l'absence d'une boîte TATA. Les promoteurs ne présentant pas de boîte TATA possèdent par contre un élément INR (Initiator Element) et/ou un élément DPE (Downstream Promoter Element). Dans le cas des promoteurs contenant une boîte TATA, la formation du PIC est initiée par la liaison de la sous-unité TBP (TATA binding protein) du complexe TFIID à la boîte TATA située environ 25 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Cette liaison est stabilisée par TFIIA (Ohkuma, 1997; Roeder, 1996). La fixation de TFIID provoque une importante distorsion de l'ADN au niveau de la boîte TATA (Kim et al., 1993) qui aide au recrutement de TFIIB. Le complexe TFIIB se lie à la protéine TBP ainsi qu'à une séquence située en aval de la boîte TATA appelée BRE (pour TFIIB-recognition element) (Lagrange et al., 1998). TFIIB définit le site d'initiation de la transcription et favorise le recrutement de l'ARN pol II et de TFIIF (Leuther et al., 1996; Pinto et al., 1992). A cette étape même si l'ARN pol II est associée au complexe de manière stable, elle ne peut initier la transcription en l'absence de TFIIE et TFIIH. TFIIE est d'abord recruté par interaction directe avec l'ARN pol II. Une fois incorporé dans le PIC, TFIIE recrute le facteur TFIIH. Ce schéma de recrutement est le schéma classiquement présenté et correspond au cas général. Une variante de ce modèle propose notamment que l'ARN pol II est recrutée au promoteur sous la forme d'une holoenzyme contenant également TFIIH, TFIIE et TFIIF. Cette holoenzyme pourrait se lier au promoteur en une seule étape, conjointement avec les autres facteurs généraux de transcription (Orphanides et al., 1996).

Le complexe ainsi formé est initialement instable étant donné que le promoteur se trouve dans une conformation « fermée » en double hélice. L'étape suivante de l'initiation est donc « l'ouverture » du promoteur provoquée par une dénaturation locale de l'ADN. Cette étape est assurée par les complexes TFIIE et TFIIH. TFIIE stabilise le complexe de pré-initiation intermédiaire via des interactions avec la quasi totalité des facteurs généraux de transcription au sein du PIC ainsi qu'avec l'ARN pol II (Ohkuma, 1997; Roeder, 1996). Quant à TFIIH, il se lie en aval de l'ARN pol II et ouvre l'ADN double brin grâce à son activité hélicase ATP-dépendante (Kim et al., 2000). L'ARN pol II peut alors accéder au brin matrice et initier la synthèse de l'ARN au niveau du point +1 d'initiation de la transcription. Après l'établissement du complexe de pré-initiation, plusieurs étapes ont été décrites *in vitro* comme étant lentes ou inefficaces. Ainsi, il a été montré que la transcription, qui est initialement inefficace, résulte souvent en la production de petits ARN avortés constitués de moins de 10 nucléotides. Néanmoins, cette initiation abortive n'a pas été montrée *in vivo*.

La liaison de ces facteurs généraux de transcription et la formation du PIC peuvent être contrôlées par d'autres facteurs de transcription, activateurs ou répresseurs. De nombreux facteurs de transcription gène-spécifiques peuvent être recrutés au niveau des promoteurs. Chaque promoteur possède un ensemble de sites particuliers qui pourront dans certaines

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

conditions recruter les facteurs de transcription. Les différentes combinaisons de facteurs de transcription ayant des effets directs ou indirects permettent de réguler finement le recrutement des facteurs généraux de transcription et l'initiation de la transcription, et donc le profil d'expression des gènes dans chaque cellule.

En plus des facteurs gène-spécifiques, des co-facteurs généraux sont également souvent requis pour la transcription dépendante des activateurs (ou régulée). Ces co-facteurs ont pour rôle de faciliter la communication entre les facteurs de transcription gène-spécifiques et les composants de la machinerie transcriptionnelle. Trois classes de co-facteurs généraux sont généralement impliquées dans l'activation des gènes, incluant certaines sous-unités du complexe TFIID appelées TAF (pour facteurs associés à TBP), le complexe Médiateur, et les co-facteurs positifs et négatifs dérivés d'USA (Upstream Stimulatory Activity).

Parmi le nombre limité de co-activateurs connus pour cibler directement l'ARN pol II, le complexe Médiateur a émergé comme étant le plus crucial. Ainsi, ce complexe protéique constitué d'environ 30 sous-unités, joue un rôle prédominant dans l'assemblage du PIC. Des études suggèrent que le Médiateur aide la transcription dépendante des activateurs en agissant comme un pont entre les facteurs de transcription se liant à l'ADN et l'ARN pol II, les facteurs généraux de transcription et les autres composants de la machinerie transcriptionnelle. Ainsi, le Médiateur se lie non seulement à l'ARN pol II et aux facteurs d'initiation, mais aussi, aux domaines d'activation de nombreux facteurs de transcription gène-spécifiques (Balamotis et al., 2009; Malik and Roeder, 2005; Myers and Kornberg, 2000; Taatjes, 2010). Les signaux régulateurs sont transmis grâce à la capacité du Médiateur à jouer le rôle d'interface entre les deux machineries. A travers ces interactions, le Médiateur peut augmenter le recrutement de l'ARN pol II et des facteurs généraux de transcription au niveau des promoteurs sur lesquels sont fixés des activateurs de transcription et ainsi promouvoir la formation du PIC. Plusieurs études ont montré que le Médiateur existe sous au moins deux formes distinctes dans les cellules. La forme la plus simple, le Médiateur « cœur », peut s'associer fermement avec l'ARN pol II pour former l'holoenzyme. Une forme alternative du Médiateur ne contient pas l'ARN pol II mais inclut un autre module appelé module kinase. La forme cœur semble responsable du rôle joué par le Médiateur dans l'activation de la transcription, tandis que la forme comprenant le module kinase pourrait également jouer un rôle répresseur (Akoulitchev et al., 2000; Elmlund et al., 2006; Knuesel et al., 2009).

I-2) Transition initiation-élongation

Une ARN pol II en élongation productive peut synthétiser la totalité de l'ARN d'une manière extrêmement processive sans se dissocier de la matrice ADN ou relarguer le transcrit naissant. Néanmoins, pour acquérir ces propriétés, l'ARN pol II initiant la transcription doit subir une maturation structurale et fonctionnelle. La libération du promoteur est la première étape de ce processus de maturation, durant laquelle la polymérase rompt ses contacts avec les séquences promotrices et avec certains facteurs liés au promoteur et resserre simultanément son étreinte sur l'ARN naissant. Certaines des interactions protéine-protéine à l'origine de l'assemblage du complexe de pré-initiation devront être rompues au cours de cette étape de libération du promoteur. Chacune de ces étapes dépend d'interactions intrinsèques de la polymérase avec l'ARN naissant et avec la matrice ADN, et est soumise à régulation par des facteurs extrinsèques. La libération du promoteur est considérée comme terminée lorsque l'ARN naissant est stablement associé au complexe de transcription.

Une première étape est franchie lorsque la taille de l'ARN synthétisé atteint une longueur de quatre nucléotides (Holstege et al., 1997; Kugel and Goodrich, 2000). Certaines interactions

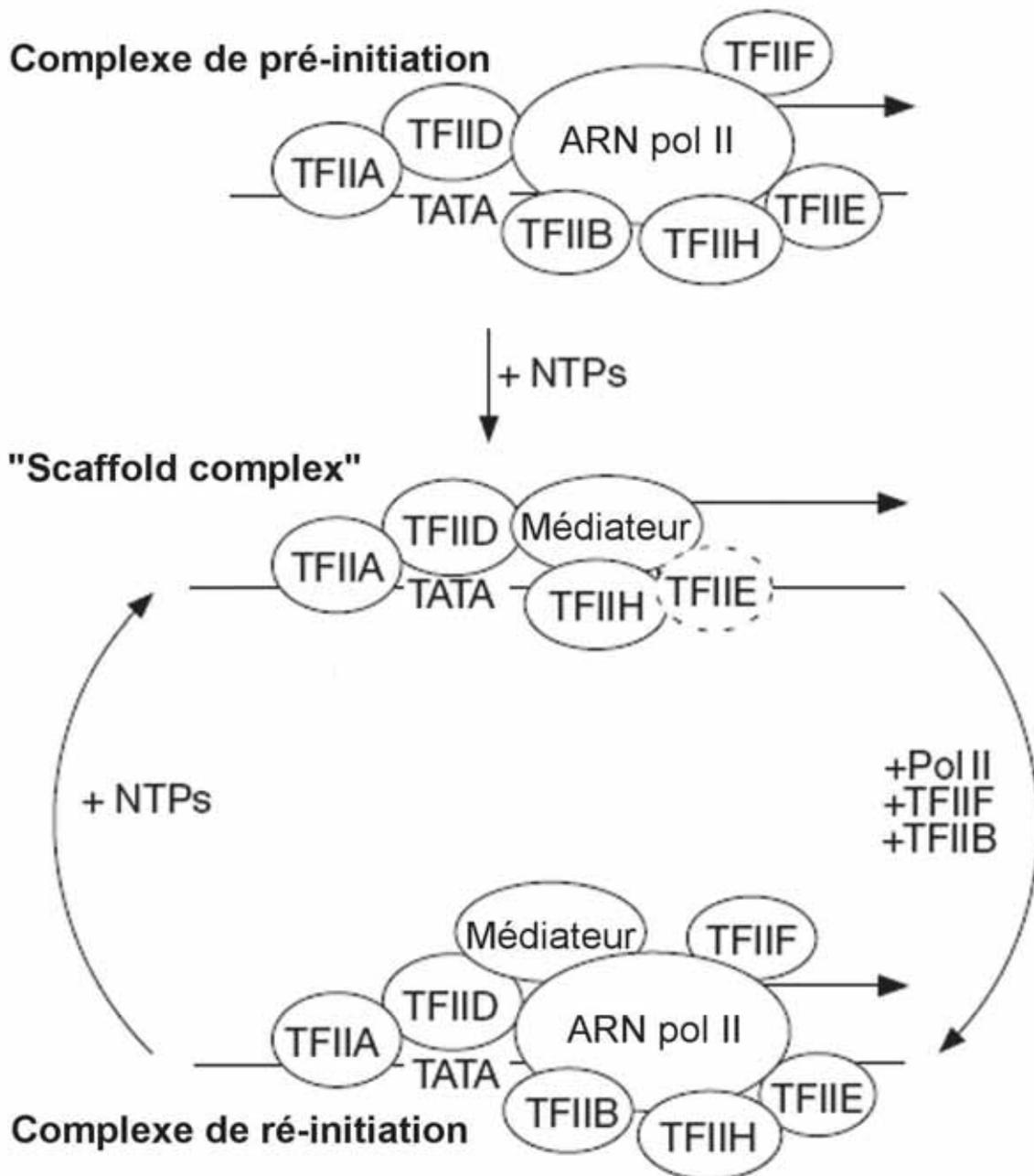


Figure 2 : Le « scaffold complex » (adapté de Yudkovsky et al, 2000)

Lorsque des NTP sont ajoutés à un complexe de pré-initiation, l'ARN pol II initie la transcription. Tandis que TFIIB et TFIIF se dissocient du promoteur, TFIID, TFIIA, TFIIF, TFIIE et le complexe Médiateur restent associés au sein du « scaffold complex » qui sert d'échafaudage pour la formation d'un complexe de ré-initiation fonctionnel. TFIIE est représenté en pointillés car il est le composant le moins stable du « scaffold complex ».

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

au sein du complexe de transcription semblent importantes pour franchir cette première étape. En effet, dans le complexe d'initiation, le domaine amino-terminal de TFIIB s'insère dans le site catalytique de l'ARN pol II et semble stabiliser l'association de l'ARN naissant avec l'ARN pol II (Bushnell et al., 2004; Chen and Hampsey, 2004; Kostrewa et al., 2009). Tandis que cette interaction aide à stabiliser le court transcrit ARN, après l'addition du cinquième nucléotide, le transcrit naissant commence à se heurter au domaine amino-terminal de TFIIB qui doit alors être déplacé. En conséquence, l'ARN croissant aide à diriger les changements conformationnels et augmente la stabilité du complexe de transcription. Enfin, lorsque le transcrit naissant a une taille de 8 à 9 nucléotides, il atteint la longueur de l'hybride ARN-ADN dans le complexe d'élongation. La formation de cet hybride ARN-ADN stable diminue la probabilité d'un relargage de l'ARN (Holstege et al., 1997; Pal and Luse, 2003; Sidorenkov et al., 1998). La partie amont de la bulle de transcription qui s'est allongée se referme à cette étape, stabilisant encore le complexe et relargant l'énergie accumulée, ce qui pourrait aider la libération du promoteur (Pal et al., 2005).

TFIIH joue également un rôle important à cette étape, non seulement en ouvrant un peu plus le double brin d'ADN en aval mais aussi en phosphorylant les résidus sérine 5 du CTD de l'ARN pol II (Kim et al., 1994). Cette phosphorylation pourrait en effet aider à rompre les contacts avec certains facteurs liés au promoteur (Liu et al., 2004).

Des analyses du devenir des facteurs généraux de transcription au cours de la transition de l'initiation à l'élongation ont montré que tous les facteurs généraux coexistent dans les complexes d'initiation matures, mais que, suite à l'ajout de nucléotides, ce complexe est déstabilisé. Durant cette transition, TFIID, TFIIA, TFIIH, TFIIE et le complexe Médiateur restent associés au promoteur tandis que TFIIB et TFIIF sont relargués (Roberts et al., 1995; Svejstrup et al., 1997; Yudkovsky et al., 2000). TFIIF est relargué du complexe d'initiation quelque part après la formation de la dixième liaison phospho-diester. Après son relargage, TFIIF peut se réassocier à l'ARN pol II en pause, ce qui rend ce facteur unique en son genre puisqu'il est le seul des facteurs de transcription généraux détecté dans les complexes d'élongation (Zawel et al., 1995).

Après l'initiation, certains facteurs généraux de transcription ainsi que le complexe médiateur restent donc au niveau du promoteur, formant une plateforme pour l'assemblage d'un second complexe de transcription (figure 2). Cet intermédiaire, appelé « scaffold complex », sert d'échafaudage pour la formation d'un complexe de ré-initiation fonctionnel.

I-3) L'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II

L'élongation de la transcription est un processus discontinu qui est fréquemment interrompu par divers facteurs. En effet, l'ARN pol II est très sensible aux signaux intrinsèques tels que des séquences et/ou des structures de l'ADN ou du transcrit naissant particulières et aux signaux extrinsèques tels que l'association de facteurs régulateurs. Ces signaux peuvent entraîner un blocage de la progression de la polymérase, qui marque alors une pause transcriptionnelle. Ces pauses ont été identifiées pour chacun des trois types d'ARN pol eucaryotes, ainsi que pour les ARN pol virales et procaryotes (Uptain et al., 1997). On parle de pause transcriptionnelle lorsque l'ARN pol interrompt l'ajout de NTP au transcrit naissant pendant un moment avant de reprendre l'élongation. La pause transcriptionnelle peut être provoquée par un glissement de l'ARN pol II vers l'arrière sur la matrice ADN, mécanisme appelé « backtracking », causant un mauvais alignement du site catalytique de l'enzyme avec l'extrémité 3'-OH du transcrit naissant, ce qui empêche la polymérase de reprendre la transcription d'elle-même. La pause transcriptionnelle peut également être indépendante de ce phénomène de « backtracking », et être liée à un réarrangement structural au sein de la

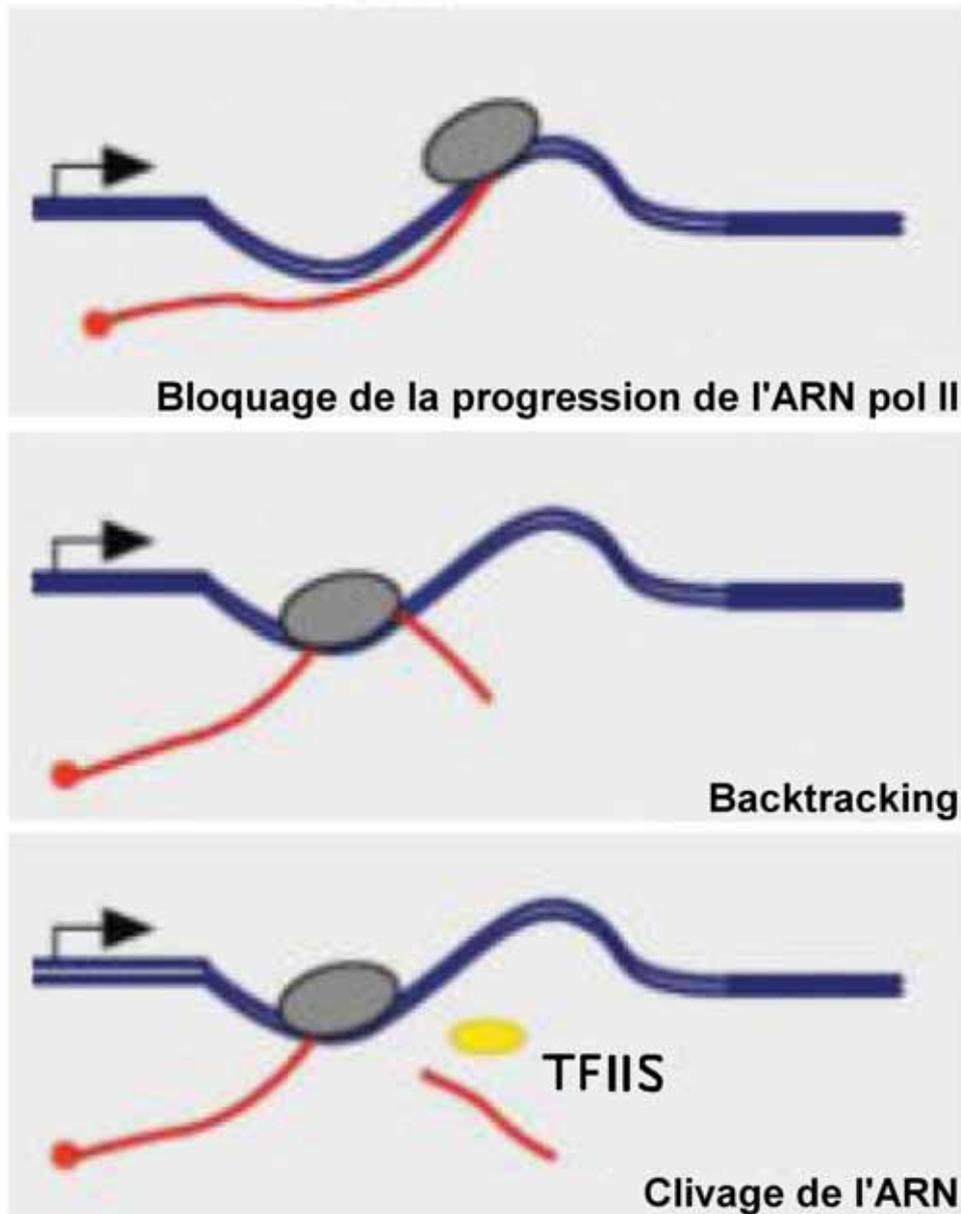


Figure 3 : Mode d'action de TFIIS

Lorsque l'ARN pol II (en gris) rencontre un site de pause, elle glisse alors en arrière de quelques nucléotides. L'extrémité 3'OH du transcrit naissant (en rouge) n'est alors plus alignée avec le site catalytique de l'ARN pol II. Le facteur de transcription TFIIS (en jaune) stimule l'activité endonucléolytique de l'ARN pol II qui clive le transcrit, ce qui permet la formation d'une nouvelle extrémité 3' de l'ARN correctement alignée avec le site catalytique de l'ARN pol II.

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

polymérase et de la séquence ADN comme cela a été montré pour une polymérase bactérienne (Erie, 2002; Neuman et al., 2003).

Divers facteurs, appelés facteurs d'élongation, ont pour rôle de contrebalancer ou de limiter ces blocages, modulant ainsi les pauses transcriptionnelles et donc la vitesse d'élongation.

Les pauses transcriptionnelles marquées par l'ARN pol II jouent des rôles clés dans la régulation de l'expression génique et permettent notamment de coordonner le déplacement de l'ARN pol II le long du gène avec la maturation co-transcriptionnelle du transcrit.

1-Les facteurs d'élongation

a) TFIIS

Lorsque l'ARN pol II glisse de quelques nucléotides vers l'arrière sur la matrice ADN dans un mouvement appelé « backtracking », elle se déplace par rapport à l'ARN naissant de sorte que l'extrémité 3'-OH de cet ARN est déplacée par rapport au site actif de la polymérase. Cette ARN pol II arrêtée ne peut pas reprendre la transcription en l'absence de facteurs stimulant le clivage de l'ARN. En effet, la formation d'une nouvelle extrémité 3'-OH de l'ARN correctement alignée avec le site actif de la polymérase est essentiel pour la reprise de l'élongation.

Le facteur accessoire TFIIS (également appelé SII) réactive les complexes de transcription ayant subi un « backtracking » en activant le clivage du transcrit par l'ARN pol II (figure 3). Cela permet le réalignement du site actif de la polymérase avec la nouvelle extrémité de l'ARN afin que la transcription puisse reprendre son cours (Izban and Luse, 1992b; Reines et al., 1992). Ainsi, l'activité de TFIIS peut entraîner une augmentation importante de la transcription globale dans des réactions de transcription reconstituées (Bengal et al., 1991; Jeon et al., 1994; Reinberg and Roeder, 1987; Sekimizu et al., 1976). Le gène codant pour TFIIS n'est pas essentiel chez la levure (Hubert et al., 1983) et les conséquences de son absence sur l'élongation de la transcription sont mineures (Mason and Struhl, 2005). Néanmoins, l'activité intrinsèque de clivage du transcrit de l'ARN pol II est essentielle. Des travaux récents menés chez la levure ont montré que la présence d'obstacles entraînant un « backtracking » de l'ARN pol II est fréquente *in vivo* et que la capacité de l'ARN pol II à cliver son transcrit en réponse à un tel « backtracking » est essentielle pour la transcription et la viabilité des cellules (Sigurdsson et al., 2010).

b) TFIIF

A côté de son rôle dans l'initiation de la transcription, le facteur général de transcription TFIIF diminue le temps des pauses marquées par l'ARN pol II et stimule la vitesse d'élongation (Bengal et al., 1991; Flores et al., 1989; Izban and Luse, 1992a; Price et al., 1989; Tan et al., 1994). Comme nous l'avons vu, TFIIF ne voyage pas avec l'ARN pol II au sein du complexe d'élongation. Néanmoins, TFIIF peut se ré-associer à l'ARN pol II lorsque celle-ci rencontre un blocage au cours de l'élongation (Zawel et al., 1995). Il a été proposé que l'association transitoire de TFIIF avec l'ARN pol II en pause induit un changement conformationnel dans la polymérase nécessaire pour une élongation optimale. TFIIF serait ensuite relargué du complexe d'élongation (Zawel et al., 1995). TFIIF apparaît donc comme un facteur d'élongation actif, mais ne reste pas associé avec l'ARN pol II en cours d'élongation.

c) Le complexe Elongin

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

Le complexe Elongin (ou SIII) est constitué de trois sous-unités, l'Elongin A est la sous-unité transcriptionnellement active tandis que les sous-unités B et C agissent comme des sous-unités régulatrices (Aso et al., 1996; Aso et al., 1995; Garrett et al., 1995; Takagi et al., 1996). L'Elongin A stimule fortement le taux d'élongation par l'ARN pol II en supprimant les pauses transitoires de la polymérase au niveau de nombreux sites. Il a été proposé que ce complexe pourrait supprimer les pauses transitoires de l'ARN pol II en aidant à maintenir l'extrémité 3'-OH de l'ARN naissant dans la bonne position dans le site actif de la polymérase (Takagi et al., 1995).

Il a été montré que le complexe Elongin n'augmente l'élongation par l'ARN pol II qu'en l'absence du facteur TFIIF dans le complexe d'élongation (Moreland et al., 1998). Il est donc possible que le complexe Elongin serve de facteur complémentaire pour supprimer les pauses transcriptionnelles au cas où TFIIF échouerait à se réassocier avec le complexe d'élongation en pause. Néanmoins, il est possible que TFIIF et le complexe Elongin jouent des rôles indépendants *in vivo*.

d) La famille des ELL

ELL (pour Eleven nineteen lysine-rich leukemia) stimule le taux de transcription de l'ARN pol II *in vitro* en réduisant les pauses (Shilatifard, 1998; Shilatifard et al., 1996). ELL pourrait stimuler l'élongation par l'ARN pol II *in vitro* en aidant à maintenir l'extrémité 3'-OH de l'ARN naissant dans le bon alignement avec le site catalytique de la polymérase, prévenant ainsi le « backtracking » de l'enzyme (Shilatifard et al., 2003).

L'homologue de ELL chez la drosophile (dELL) a été identifié comme un facteur essentiel au cours du développement, indiquant que ELL joue un rôle non redondant et distinct de ceux de TFIIF et du complexe Elongin *in vivo* (Eissenberg et al., 2002; Gerber et al., 2001). En réponse à un choc thermique, dELL est recruté sur les gènes codants pour des protéines heat-shock (Gerber et al., 2001), et sa présence avec l'ARN pol II à ces loci est requise pour stimuler l'expression des gènes heat-shock (Eissenberg et al., 2002; Shilatifard, 2004; Smith et al., 2008).

Par ailleurs, une étude récente a montré qu'une diminution de l'expression de ELL, dans des cellules humaines en culture par ARN interférence (ARNi), entraînait une déstabilisation du PIC et une perturbation de l'élongation précoce (Byun et al., 2012). Ces résultats suggèrent que ELL pourrait également jouer un rôle beaucoup plus précoce au cours du cycle de transcription par l'ARN pol II.

e) PAFc

Le facteur d'élongation PAF1c (pour Polymerase Associated Factor complex) augmente les taux d'élongation de la transcription tant sur de l'ADN nu que sur la chromatine (Kim et al., 2010; Rondon et al., 2004), et fonctionne de concert avec nombre d'autres facteurs modulant la structure de la chromatine et la maturation des ARN (Jaehning, 2010). Tandis que PAF1c peut clairement influencer l'élongation productive, plusieurs études suggèrent également un rôle pour PAF1c dans le contrôle de l'élongation précoce. En effet, il a notamment été suggéré que PAF1c pourrait jouer un rôle au cours de l'activation de gènes heat-shock chez la drosophile (Adelman et al., 2006). De plus, PAFc interagit avec de nombreux facteurs régulant l'élongation de la transcription tels que DSIF, Tat-SF1, TFIIS ou encore le Super Elongation Complex (SEC) que nous aborderons dans le chapitre III (Bai et al., 2010; Chen et al., 2009; He et al., 2011; Kim et al., 2010; Sobhian et al., 2010). A travers ces diverses interactions, PAFc pourrait jouer divers rôles dans la régulation de l'élongation de la transcription. Ce facteur d'élongation pourrait notamment connecter le SEC à l'ARN pol II

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

sur la chromatine (He et al., 2011), ou encore coopérer avec Tat-SF1 et DSIF pour stimuler l'élongation de la transcription par l'ARN pol II (Chen et al., 2009).

2- La pause transcriptionnelle imposée par les facteurs négatifs d'élongation de la transcription

Jusqu'à récemment, le contrôle transcriptionnel de la plupart des gènes était considéré comme lié uniquement à la régulation du recrutement de l'ARN Pol II sur le promoteur. Néanmoins, des études de plus en plus nombreuses montrent que l'ARN pol II s'arrête souvent juste après la libération du promoteur, environ 20 à 40 nucléotides en aval du point d'initiation de la transcription. La libération de l'ARN pol II de cette pause émerge comme un mécanisme majeur du contrôle de l'expression génique au cours du développement. En effet, il a été montré que, dans les cellules humaines, un nombre significatif de promoteurs (5% des promoteurs analysés) sont occupés par la machinerie transcriptionnelle mais ne produisent pas de transcrits, indiquant que le recrutement de la polymérase ne semble pas limitant pour l'expression de ces gènes (Kim et al., 2005). Il a également été démontré qu'une fraction significative des gènes sur lesquels la transcription est initiée dans les cellules humaines ne sont pas transcrits de façon productive, suggérant un blocage au cours de l'élongation de la transcription (Guenther et al., 2007). Par ailleurs, deux analyses menées à l'échelle du génome entier chez la drosophile ont montré que la pause marquée par l'ARN Pol II à proximité du promoteur n'est pas un phénomène isolé mais un événement plutôt commun dans les organismes supérieurs (Muse et al., 2007; Zeitlinger et al., 2007). Des analyses en «run-on sequencing» menées à l'échelle du génome entier dans des cellules humaines (Core et al., 2008), ou des cellules souches embryonnaires ou des fibroblastes embryonnaires de souris (Min et al., 2011), ont permis de déterminer qu'environ 30 à 40% des gènes présentent un pic d'ARN pol II engagées, caractéristique d'une pause transcriptionnelle. Par ailleurs, une équipe a entrepris d'isoler et de caractériser les ARN courts dérivés des ARN pol II en pause dans les cellules de drosophile. Des niveaux significatifs de ces ARN courts sont générés à partir d'environ un tiers des gènes, indiquant que la pause transcriptionnelle à proximité du promoteur est une caractéristique générale des ARN pol II en élongation précoce (Nechaev et al., 2010). Enfin, une analyse par ChIP-séquençage a montré que dans des cellules souches embryonnaires de souris, la pause transcriptionnelle à proximité du promoteur survient sur la majorité des gènes, aussi bien ceux activement transcrits que ceux dont la transcription est initiée mais dont l'élongation est bloquée (Rahl et al., 2010).

Toutes ces études prouvent que la pause transcriptionnelle marquée par l'ARN pol II à proximité du promoteur est une caractéristique générale du cycle de transcription. L'une des fonctions majeures de la pause marquée par l'ARN pol II à proximité du promoteur serait de maintenir un environnement transcriptionnellement permissif au niveau du promoteur. En effet, l'ARN pol II en pause semble empêcher le positionnement des nucléosomes au niveau du promoteur en entrant en compétition avec ces derniers pour l'occupation du promoteur (Gilchrist et al., 2010; Palermo et al., 2011).

a) Les facteurs imposant la pause transcriptionnelle à proximité du promoteur

La majeure partie des informations concernant la pause transcriptionnelle à proximité du promoteur provient d'études réalisées avec un analogue de nucléoside appelé DRB, pour 5,6-dichloro-1-4-D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB), inhibant l'élongation de la transcription par l'ARN pol II (Chodosh et al., 1989; Fraser et al., 1978; Sehgal et al., 1976). Deux facteurs négatifs d'élongation de la transcription (ou N-TEF) ont ainsi été identifiés, le complexe hétéro-dimérique DSIF (pour DRB Sensitivity Inducing Factor) (Wada et al., 1998a), et le

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

complexe NELF (pour Negative Elongation Factor) (Yamaguchi et al., 1999). DSIF et NELF, coopèrent pour inhiber l'élongation de la transcription, après la synthèse d'un ARN d'environ 30 nucléotides (Renner et al., 2001; Yamaguchi et al., 1999).

DSIF est constitué des facteurs d'élongation Spt4 et Spt5, qui sont conservés de la levure à l'Homme (Hartzog et al., 1998). NELF est constitué de quatre sous-unités, NELF-A, B, C/D et E, et est conservé entre les eucaryotes supérieurs, mais n'a pas été identifié chez *C. elegans*, *S. cerevisiae* ou *A. thaliana* (Narita et al., 2003). Il a été montré que la protéine NELF-A s'associe à l'ARN pol II (Narita et al., 2003), cette protéine pourrait donc ancrer le complexe NELF au complexe d'élongation. La sous-unité NELF-E contient, quant à elle, un motif de liaison à l'ARN. Mais il semble que NELF ait une faible affinité pour l'ARN (Rao et al., 2006). Ainsi, dans une étude récente qui a montré que NELF ne s'associe au complexe d'élongation qu'en présence de DSIF, aucun contact entre NELF et l'ARN n'a pu être détecté (Missra and Gilmour, 2010). Or, il a été montré que la sous-unité Spt5 de DSIF entre en contact avec l'ARN naissant alors qu'il émerge du complexe d'élongation (Cheng and Price, 2008; Missra and Gilmour, 2010). Il est donc probable que ce soit DSIF plutôt que NELF qui reconnaisse le transcrit. Ce contact entre DSIF et l'ARN pourrait jouer un rôle décisif dans la pause marquée par l'ARN pol II. En effet, la distance entre le site d'initiation de la transcription et l'ARN pol II en pause pourrait être imposée par la longueur du transcrit nécessaire pour l'association de DSIF avec le complexe d'élongation (Cheng and Price, 2008; Missra and Gilmour, 2010). NELF joue néanmoins un rôle crucial dans la pause transcriptionnelle à proximité des promoteurs. En effet, une diminution des niveaux de NELF par ARNi dans des cellules de drosophile entraîne une perte des ARN pol II en pause à proximité des promoteurs (Gilchrist et al., 2010; Gilchrist et al., 2008).

Des analyses par CHIP ont montré que NELF est présent à proximité du promoteur mais ne se déplace pas le long du gène avec le complexe d'élongation, de façon consistante avec une dissociation de NELF lors de la libération de l'ARN pol II de cette pause transcriptionnelle (Aida et al., 2006; Lee et al., 2008; Rahl et al., 2010; Wu et al., 2003a). Contrairement à NELF, DSIF reste associé à l'ARN pol II après sa transition en élongation productive (Andrulis et al., 2000; Kaplan et al., 2000). DSIF fonctionne alors comme un facteur positif d'élongation capable de réduire les arrêts de l'ARN pol II aux sites de pause, prévenant la libération du transcrit et stimulant l'élongation (Bourgeois et al., 2002; Wada et al., 1998a). DSIF est donc considéré comme un facteur d'élongation de la transcription ayant des propriétés positives et négatives, il est donc possible que ces effets soient influencés par son association avec d'autres facteurs. DSIF joue un rôle important dans la pause transcriptionnelle. En effet, sur le gène *A20* humain, il a été rapporté que la pause transcriptionnelle à proximité du promoteur implique DSIF mais pas NELF (Ainbinder et al., 2004). Chez *C. elegans*, qui possède DSIF mais pas NELF, la pause à proximité du promoteur survient en réponse à une privation de nutriments (Baugh et al., 2009). De plus, le complexe DSIF est présent chez tous les eucaryotes, chez les archées, et présente une homologie avec le facteur de transcription bactérien NusG (Hirtreiter et al., 2010). Il est donc probable que DSIF soit un facteur fondamental pour la transcription ARN pol II-dépendante, tandis que NELF pourrait jouer un rôle dans l'établissement de la pause au cours de l'élongation précoce spécifiquement chez les métazoaires.

b) Les facteurs permettant la levée de la pause transcriptionnelle

Les études menées avec le DRB ont montré que cet analogue de nucléoside n'inhibe pas l'ARN pol II directement, mais agit plutôt sur un autre facteur (Marshall and Price, 1992). Ce facteur a ensuite été identifié comme étant le facteur positif d'élongation de la transcription (P-TEFb) (Marshall and Price, 1995), que nous verrons de manière plus détaillée dans le

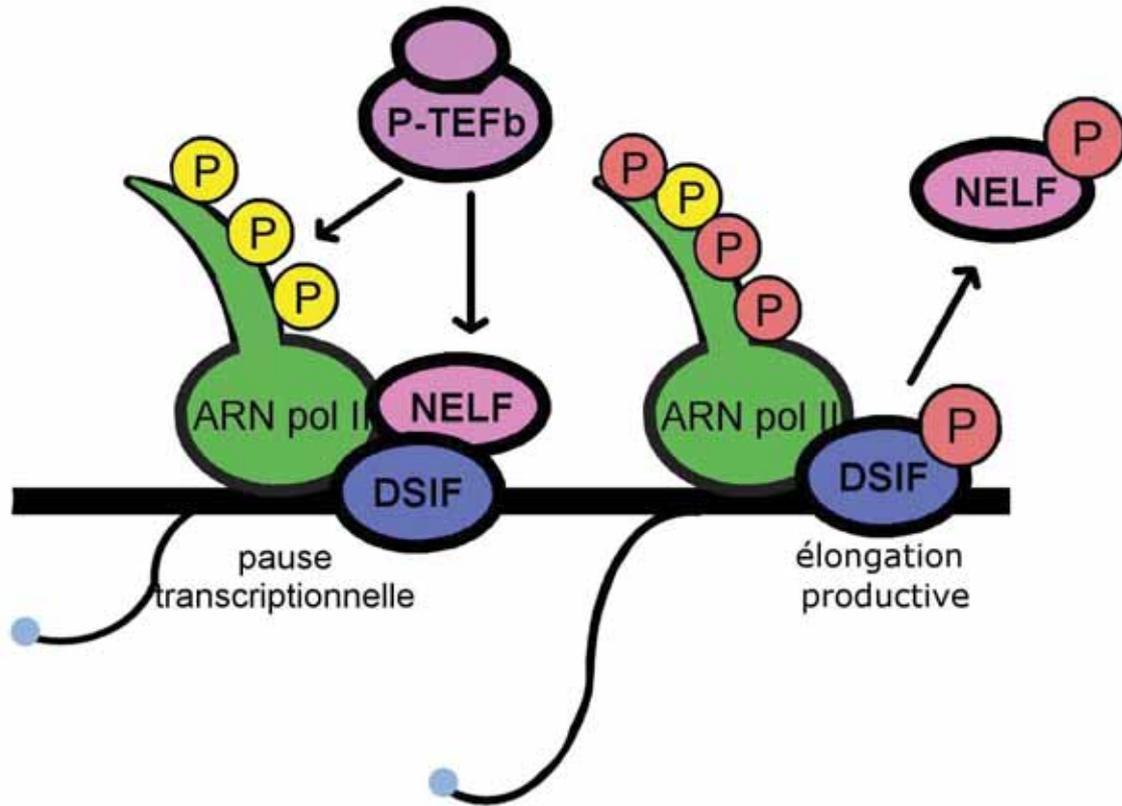


Figure 4 : P-TEFb lève la pause transcriptionnelle marquée par l'ARN pol II à proximité du promoteur

Peu après l'initiation de la transcription la progression de l'ARN pol II est bloquée par l'action concertée des deux facteurs négatifs d'élongation (N-TEF), DSIF et NELF. Pour contrecarrer l'action de N-TEF, le facteur d'élongation de la transcription P-TEFb phosphoryle DSIF, NELF et les résidus Ser2 du CTD de l'ARN pol II. Ces événements de phosphorylation facilitent la reprise d'une élongation productive en causant la dissociation de NELF de l'ARN pol II et en convertissant DSIF en activateur de la transcription.

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

chapitre III. P-TEFb est un hétérodimère composé d'une protéine kinase, la CDK9 (pour Cyclin-Dependent Kinase-9) et de son partenaire cycline, la cycline T1 ou T2 (Peng et al., 1998a; Peng et al., 1998b). P-TEFb phosphoryle le CTD de l'ARN pol II sur la sérine 2, le domaine carboxy-terminal de la sous-unité Spt5 de DSIF et la sous-unité NELF-E de NELF (Fujinaga et al., 2004; Ivanov et al., 2000; Marshall et al., 1996; Yamada et al., 2006). Ces événements de phosphorylation facilitent la reprise d'une élongation productive en causant la dissociation de NELF de l'ARN pol II et en convertissant DSIF en activateur (figure 4) (Wada et al., 1998a; Yamada et al., 2006). Dans des extraits immunodéplétés en DSIF et NELF, P-TEFb n'est plus nécessaire pour une élongation productive, démontrant que la principale fonction de P-TEFb est de contrecarrer l'effet négatif des N-TEF (Wada et al., 1998a; Yamaguchi et al., 1999).

3- L'élongation à travers les nucléosomes

En plus des signaux induisant les pauses, l'ARN pol II doit également faire face aux barrages créés par les nucléosomes qui limitent sa progression et répriment l'élongation de la transcription. Pour faciliter la progression de l'ARN polymérase à travers la chromatine, les nucléosomes peuvent être partiellement désassemblés et déplacés du trajet de la polymérase, ou leurs propriétés peuvent être altérées par des modifications covalentes des histones.

a) Modification des histones

Les modifications covalentes d'histones influençant l'élongation de la transcription incluent l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitylation. Les modifications d'histones peuvent changer les propriétés physiques et chimiques de la chromatine, altérer la capacité d'autres facteurs à manipuler la chromatine, et peuvent également influencer le recrutement de nombreux facteurs au niveau du gène. Le complexe d'élongation de la transcription est ciblé par diverses protéines qui modifient la chromatine. Parmi les modifications d'histones influençant positivement l'élongation de la transcription on trouve, entre autres, la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3, la méthylation de la lysine 36 de l'histone H3, ou encore l'acétylation des histones H3 et H4 (Kristjuhan et al., 2002).

La triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) est concentrée au niveau de l'extrémité 5' des gènes et est associée à une transcription active (Liu et al., 2005; Pokholok et al., 2005; Schneider et al., 2004). Les membres de la famille de protéines Set1 méthylent la H3K4 (Dillon et al., 2005).

La méthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36) tend, quant à elle, à être présente dans les régions codantes des gènes transcriptionnellement actifs (Krogan et al., 2003; Pokholok et al., 2005; Rao et al., 2005). Les membres de la famille de protéines Set2 méthylent la H3K36 (Dillon et al., 2005).

L'un des facteurs majeurs dans l'acétylation des histones est le complexe élongateur. Ce complexe composé de plusieurs sous-unités possède une activité lysine acétyl-transférase spécifique des histones H3 et H4 (Winkler et al., 2002). *In vitro*, l'élongateur facilite la transcription par l'ARN pol II à partir d'une matrice chromatiniennne, tandis qu'il n'a pas d'influence sur la transcription sur de l'ADN nu (Kim et al., 2002; Krogan and Greenblatt, 2001), et *in vivo*, des niveaux réduits de certaines sous-unités de l'élongateur affectent l'expression de certains gènes (Close et al., 2006).

b) Repositionnement des nucléosomes

Des facteurs régulant le positionnement des nucléosomes et leur structure sont également requis pour une transcription efficace. Ces facteurs incluent les complexes de remodelage de

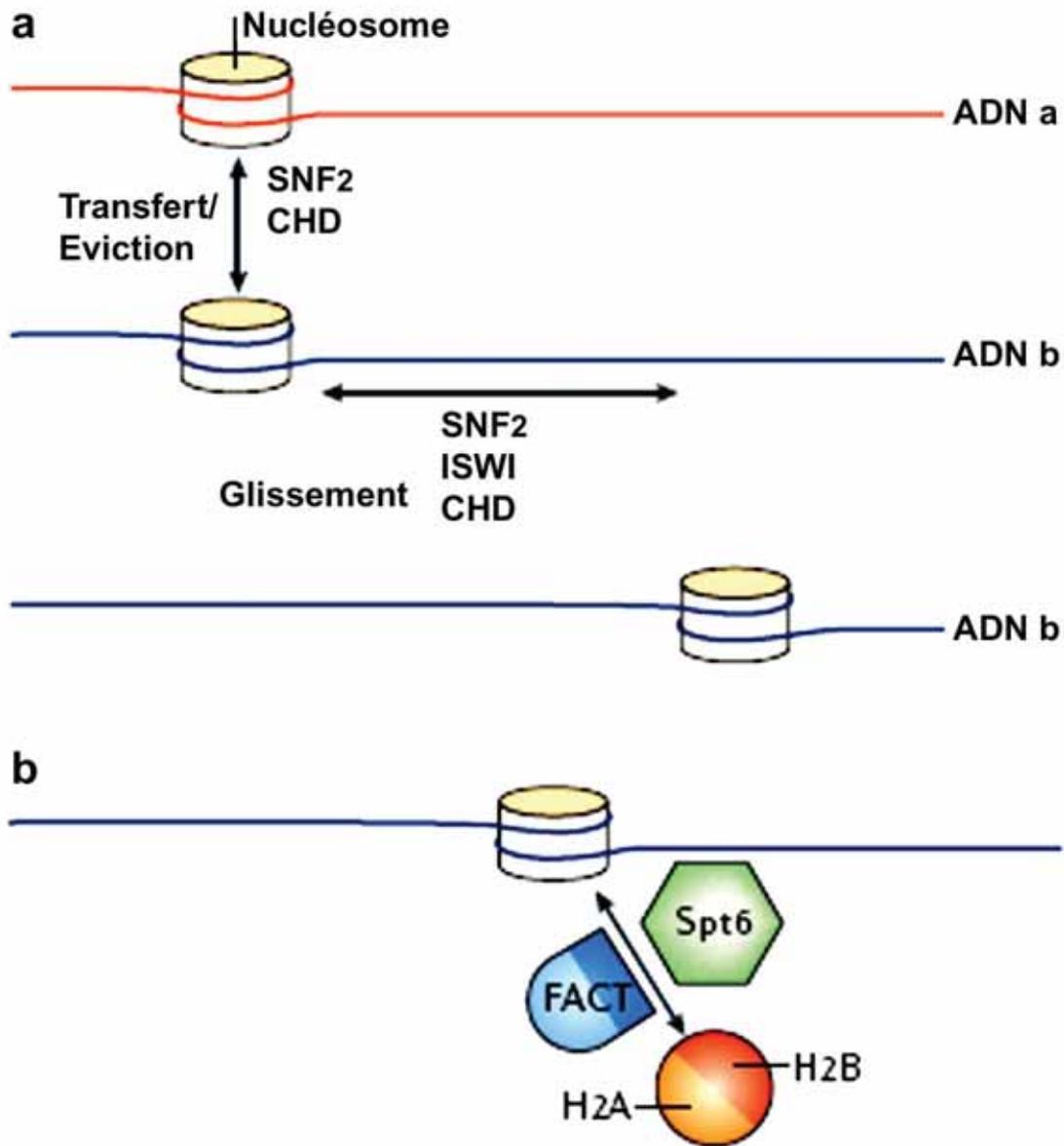


Figure 5 : Remodelage des nucléosomes et enzymes d'assemblage/désassemblage (d'après Saunders et al., 2006)

a) Les 3 grandes familles de remodelage de la chromatine ATP-dépendant impliquées dans l'élongation de la transcription : SWI/SNF, ISWI et CHD. Elles peuvent soit repositionner les nucléosomes par un transfert en *trans* vers une autre molécule d'ADN (par exemple de l'ADNb à l'ADNa), ou en *cis*, en faisant glisser les nucléosomes en avant ou en arrière de leur position d'origine.

b) Le désassemblage/réassemblage des nucléosomes, par des facteurs comme FACT ou Spt6, peut faciliter la transcription d'une matrice de chromatine en retirant un dimère d'histone H2A/H2B du nucléosome. Le réassemblage des nucléosomes après la transcription par l'ARN pol II est essentiel pour prévenir des transcriptions aberrantes depuis les promoteurs cryptiques.

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

la chromatine et les chaperones d'histones impliquées dans le désassemblage et le ré-assemblage des nucléosomes.

Les complexes de remodelage de la chromatine

Les facteurs de remodelage de la chromatine sont des ATPases qui transloquent l'ADN, ce qui provoque des glissements ou parfois des transferts ou évictions de nucléosomes. Il existe quatre familles de remodeleurs de chromatine ATP-dépendants : les familles ISWI, SNF2, CHD et INO80/SWR. Aucune de ces familles de remodeleurs n'est liée exclusivement à l'élongation de la transcription. Les remodeleurs de chromatine sont définis principalement pour leur rôle dans la régulation de l'architecture des promoteurs. Malgré tout, certains remodeleurs de chromatine ont également été associés avec des régions codantes, et plus particulièrement les membres des familles ISWI, SNF2 et CHD : ISW1, SWI/SNF et CHD1 respectivement (figure 5) (Corey et al., 2003; Morillon et al., 2003; Simic et al., 2003; Zhao et al., 2005a).

CHD1 remodèle les nucléosomes *in vitro* et joue un rôle dans l'élongation (Tran et al., 2000). Des études menées sur des chromosomes polytènes de drosophile ont révélé que CHD1 s'associe avec les sites de transcription actifs (Stokes et al., 1996). De plus, CHD1 interagit physiquement avec les facteurs d'élongation PAFc, DSIF, et FACT (Kelley et al., 1999; Krogan et al., 2002; Simic et al., 2003) et avec l'histone H3 méthylée sur la lysine 4 de façon transcription-dépendante, soulignant son rôle dans l'élongation de la transcription (Sims et al., 2005).

Le complexe SWI/SNF humain est requis pour l'initiation et l'élongation de la transcription sur le gène *hsp70* humain *in vitro* (Brown et al., 1996). Plusieurs études ont apporté d'autres preuves pour le rôle joué par SWI/SNF au cours de l'élongation *in vivo*, soulignant le rôle du remodelage de la chromatine comme un élément du processus d'élongation de la transcription (Corey et al., 2003; Davie and Kane, 2000; Sullivan et al., 2001). Les complexes SWI/SNF humain et de levure sont associés avec l'ARN pol II (Cho et al., 1998; Wilson et al., 1996), suggérant qu'ils pourraient être recrutés ensemble au niveau des gènes transcrits.

Les chaperones d'histones

Les facteurs d'assemblage des histones, aussi appelé chaperones d'histones, lient les histones et assurent leur assemblage correct en nucléosomes. Les chaperones d'histones FACT et Spt6 sont impliqués dans le désassemblage et le ré-assemblage des nucléosomes (figure 5). Au cours de l'élongation de la transcription, ils facilitent le passage de la machinerie transcriptionnelle à travers la barrière formée par les nucléosomes en déstabilisant ces derniers en avant de la polymérase, et re-déposent les nucléosomes dans le sillage de la machinerie transcriptionnelle.

Le complexe FACT (Facilitates Chromatin Transcription) agit après l'initiation pour permettre la transcription à travers les nucléosomes (Belotserkovskaya et al., 2003). FACT se lie directement aux nucléosomes et facilite le déplacement des dimères H2A-H2B pour rendre l'ADN plus accessible au cours de la transcription (Belotserkovskaya et al., 2003; Orphanides et al., 1999; Reinberg and Sims, 2006). Par ailleurs, il a été montré que FACT prévient l'initiation cryptique de la transcription par l'ARN pol II chez la levure, démontrant son rôle dans le maintien de la structure chromatinienne au cours de l'élongation (Mason and Struhl, 2003).

Spt6 facilite l'élongation de la transcription par l'ARN pol II *in vivo* (Ardehali et al., 2009). Ce facteur interagit physiquement avec les histones *in vitro*, et possède une activité chaperone d'histones (Bortvin and Winston, 1996). Spt6 se lie préférentiellement aux histones H3 et H4,

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

et est localisé au niveau des régions activement transcrites par l'ARN pol II (Andrulis et al., 2000; Kaplan et al., 2000). Spt6 est requis pour le ré-assemblage des nucléosomes sur les gènes activement transcrits après le passage du complexe de transcription (Ivanovska et al., 2011). Ce rôle dans le ré-assemblage des nucléosomes pourrait expliquer son implication dans la prévention de l'initiation cryptique de la transcription par l'ARN pol II chez la levure (Kaplan et al., 2003).

c) Coopération entre les complexes de transcription pour franchir la barrière chromatiniennne

La maintenance de l'état de la chromatine et du patron de modification des histones est essentiel pour une régulation correcte de l'expression des gènes. Cette maintenance de l'organisation des nucléosomes durant le passage de l'ARN pol II est accompagnée par le rétablissement de la structure des nucléosomes. Sur des gènes modérément transcrits, seuls les dimères H2A-H2B sont déplacés (Dion et al., 2007; Jamai et al., 2007; Rufiange et al., 2007; Schwartz and Ahmad, 2005; Thiriet and Hayes, 2005; Wirbelauer et al., 2005). Au contraire, sur des gènes activement transcrits, toutes les histones cœur sont déplacées (Kristjuhan and Svejstrup, 2004; Lee et al., 2004; Schwabish and Struhl, 2004). Ces études suggèrent qu'au cours de la transcription par l'ARN pol II *in vivo*, les dimères d'histones H2A-H2B sont déplacés de manière constitutive, tandis que les histones H3/H4 sont déplacées uniquement lorsque le niveau de transcription est élevé. Des études menées *in vitro* ont confirmé que de multiples complexes de transcription peuvent efficacement franchir la barrière formée par les nucléosomes et déplacer les octamères d'histones complets, confirmant les observations faites *in vivo* (Kulaeva et al., 2010). Ainsi, l'hexamère d'histones laissé en arrière du premier complexe de transcription est déplacé par le complexe de transcription suivant (Kulaeva et al., 2010).

I-4) La terminaison de la transcription

La terminaison se produit lorsque l'ARN pol II cesse la synthèse de l'ARN et que la polymérase et l'ARN naissant se détachent de la matrice ADN. La terminaison assure de nombreuses fonctions vitales dans la cellule. Elle prévient notamment l'interférence de la polymérase avec des éléments ADN situés en aval, tels que des promoteurs, et elle permet le recyclage de la polymérase. Des études récentes ont révélé que la majorité du génome est transcrit, produisant un très grand nombre d'ARN non codants (Jacquier, 2009). L'importance de la terminaison de la transcription dans le partitionnement du génome a donc pris beaucoup d'ampleur à la suite de ces découvertes. En effet, le volume de trafic résultant de cette transcription pervasive requiert une terminaison efficace par l'ARN polymérase pour éviter des interférences avec les unités transcriptionnelles voisines. Des études récentes ont également montré l'importance de la terminaison pour la synthèse de l'ARNm. Ainsi, une terminaison défective à l'extrémité 3' d'un gène transcrit par l'ARN pol II entraîne une diminution de l'épissage et une augmentation de la dégradation de l'ARN (West and Proudfoot, 2009), ainsi qu'une diminution de l'initiation de la transcription sur ce gène (Mapendano et al., 2010). Cela pourrait servir de mécanisme de contrôle, diminuant la transcription lorsque la terminaison échoue.

La terminaison de la transcription par l'ARN pol II peut se faire par différents moyens en fonction des signaux de maturation en 3' de l'ARN et des facteurs de terminaison présents à l'extrémité du gène (Lykke-Andersen and Jensen, 2007; Richard and Manley, 2009; Rondon et al., 2008). Deux des voies les mieux étudiées sont la voie dépendante du signal de polyadénylation (poly(A)) et la voie dépendante de Sen1.

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

1- Terminaison dépendante du poly(A)

La terminaison de la transcription par l'ARN pol II en aval de la plupart des gènes codant des protéines est couplée fonctionnellement avec un événement de maturation (Birse et al., 1998; Buratowski, 2005; Hirose and Manley, 2000; Proudfoot, 2004; Yonaha and Proudfoot, 2000) au cours duquel l'extrémité 3'-OH du transcrit naissant subit un clivage et une polyadénylation (Connelly and Manley, 1988; Logan et al., 1987; Whitelaw and Proudfoot, 1986). Cette maturation en 3' peut être divisée en deux étapes : dans un premier temps, la transcription du site poly(A) est suivie d'une pause de l'ARN pol II et d'un clivage endoribonucléolytique du transcrit naissant ; dans un deuxième temps le pré-ARNm est polyadénylé, tandis que le produit de clivage 3' est dégradé. Deux complexes protéiques, le facteur de spécificité de clivage et polyadénylation (CPSF) et le facteur stimulateur du clivage (CstF), reconnaissent ensemble les séquences 5'AAUAAA3' et DES (riche en GU) sur le transcrit et entraînent le clivage entre ces éléments. La poly(A) polymérase est recrutée au niveau de ce complexe de maturation en 3', entraînant la polyadénylation de l'extrémité 3'-OH de l'ARN en 5' du site clivage. Pour autant, la terminaison de la transcription, qui est également définie par la dissociation de l'ARN pol II de la matrice ADN, n'est pas effective. En effet, le clivage au site poly(A) peut avoir lieu alors que l'ARN pol II est toujours associée à la matrice (West et al., 2008). Ainsi, il a été montré que le clivage au site poly(A) génère un ARN résiduel ayant une extrémité 5' non coiffée, ce qui crée un site d'entrée pour l'exoribonucléase 5'-3' Xrn2. Xrn2 dégrade alors rapidement l'ARN non coiffé résiduel toujours attaché à l'ARN pol II en élongation. Lorsque Xrn2 atteint l'ARN pol II en élongation, cela entraîne la terminaison en induisant des changements conformationnels dans le site actif de l'ARN pol II liés à la perte de son ARN naissant associé (Connelly and Manley, 1988; Kuehner et al., 2011; Proudfoot, 1989). Ce mécanisme appelé modèle torpédo, agit de concert avec les facteurs de clivage et polyadénylation pour favoriser la terminaison de la transcription (Kuehner et al., 2011; Richard and Manley, 2009). Deux types d'éléments terminateurs peuvent favoriser le processus de terminaison. Le premier type d'éléments agit comme un site de pause transcriptionnel situé en aval du site pol(A), qui en ralentissant l'élongation, accorde plus de temps à Xrn2 pour dégrader le transcrit naissant et donc pour atteindre l'ARN pol II (Gromak et al., 2006; Plant et al., 2005). Ces sites de pause sont des séquences riches en G qui favorisent la formation d'hybrides ARN/ADN (appelés R-loops) en arrière de l'ARN pol II en élongation. La résolution de ces hybrides est nécessaire pour permettre l'accès de Xrn2 pour la dégradation du transcrit en 3' du site de clivage poly(A) et la terminaison en résultant. La résolution de ces hybrides ARN/ADN nécessite l'action d'hélicases spécifiques : Sen1 chez la levure et la senataxin chez les mammifères (Mischo et al., 2011; Skourti-Stathaki et al., 2011). L'autre type d'élément terminateur, nommé CoTC pour cotranscriptional cleavage (Dye and Proudfoot, 2001), n'a pour le moment été identifié que dans certains gènes globine et se trouve généralement situé environ 1 kb en aval du poly(A). La terminaison médiée par les éléments CoTC opère probablement lorsqu'il n'y a pas de sites de pause à proximité du site poly(A), de sorte que l'ARN pol II poursuit sa route plus loin dans la région 3' flanquante. Comme leur nom l'indique, les séquences ARN CoTC sont très instables, de sorte que dès qu'elles émergent du canal de sortie de l'ARN pol II, l'ARN est clivé (West et al., 2008). Cela crée un site d'entrée pour Xrn2 qui peut alors dégrader directement l'ARN naissant à partir de cette extrémité 5' non coiffée. Comme le clivage survient à proximité de la polymérase en élongation, la terminaison s'ensuit rapidement.

2- Terminaison dépendante de Sen1

Chez la levure *S. cerevisiae*, la terminaison de la transcription par l'ARN pol II de la plupart des ARN non codants utilise un mécanisme alternatif impliquant le complexe NRD. Contrairement aux ARNm, les extrémités 3' des snARN et des snoARN sont générées par un clivage endoribonucléolytique et/ou une dégradation ribonucléolytique par le complexe exosome nucléaire-TRAMP, et ne possèdent pas de queue poly(A) dans leur forme mature. Un groupe de facteurs cœurs est requis pour la reconnaissance et la transduction du signal de terminaison de la transcription, incluant les protéines de liaison à l'ARN Nrd1 et Nab3, et l'hélicase ARN/ADN Sen1 (Kim et al., 1999; Steinmetz and Brow, 1996; Steinmetz et al., 2001; Steinmetz et al., 2006). Dans cette voie, il est proposé que Sen1 (l'homologue chez la levure de la senataxin humaine) entraîne la terminaison de la transcription par l'ARN pol II en séparant l'hybride ARN/ADN dans le site actif (Steinmetz and Brow, 1996). Malgré tout, contrairement à Sen1, son homologue la senataxin ne semble pas être requise pour la terminaison de la transcription des ARN non codants (Suraweera et al., 2009).

II) Le domaine Carboxy-terminal de l'ARN polymérase II

L'ARN pol II est un très gros complexe constitué de douze sous-unités, nommées Rpb1 à Rpb12, avec un poids moléculaire total de 0,5 MDa. Le domaine carboxy-terminal (CTD) de la plus grande des sous-unités, Rpb1, présente un motif heptapeptidique Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser répété en tandem. Tandis que les trois ARN polymérases ont la même origine évolutive et ont une composition en sous-unités similaire, le CTD est unique à l'ARN pol II et sa longueur semble corrélée à la complexité du génome. En effet, le nombre de répétitions du motif varie, allant de 26 répétitions chez la levure, 32 chez le nématode, 45 chez la drosophile à 52 chez l'Homme. Chez la plupart des animaux, des plantes ou des champignons, la majorité des motifs heptapeptidiques du CTD suivent la séquence consensus. Par contre, parmi les 52 répétitions du CTD de l'ARN pol II des mammifères, 21 suivent la séquence consensus tandis que les autres répétitions montrent une variété de substitutions principalement dans la partie carboxy-terminale (Corden, 1990). Chez les mammifères, à l'extrémité carboxy-terminale, le CTD comporte un motif spécifique de dix acides aminés. Les divergences par rapport à la séquence consensus dans la partie distale du CTD chez les mammifères pourraient jouer un rôle crucial dans la régulation de l'expression génique.

Tandis que le CTD est indispensable *in vivo* (Allison et al., 1985; Bartolomei et al., 1988; Nonet et al., 1987; Zehring et al., 1988), il n'est pas requis pour l'initiation médiée par les facteurs généraux de transcription et la synthèse d'ARN *in vitro* (Akoulitchev et al., 1995; Buratowski and Sharp, 1990; Kang and Dahmus, 1993; Kim and Dahmus, 1989; Zehring et al., 1988). Le CTD sert en réalité de plateforme pour l'interaction d'un très grand nombre de facteurs nucléaires (Phatnani and Greenleaf, 2006) et joue un rôle majeur dans la transcription et la maturation co-transcriptionnelle des pré-ARNm (McCracken et al., 1997a; Ryman et al., 2007). Les divers résidus du CTD peuvent être modifiés post-traductionnellement par phosphorylation, glycosylation, méthylation et/ou isomérisation des prolines. La modification dynamique et réversible du CTD favorise le recrutement de facteurs de transcription et de maturation aux différentes étapes du cycle de transcription. Ces interactions dynamiques permettent le couplage et la coordination des différentes étapes du cycle de transcription avec les autres événements nécessaires à l'expression génique.

Le CTD est le site majeur de phosphorylations réversibles de l'ARN pol II. En effet, cinq des sept résidus consensus peuvent être phosphorylés. Les résidus sérines 2 et 5 (Ser2 et Ser5) ont été identifiés comme des sites de phosphorylation majeurs. Plus récemment, d'autres modifications et notamment les phosphorylations de la sérine 7 (Ser7) (Egloff et al., 2007) et

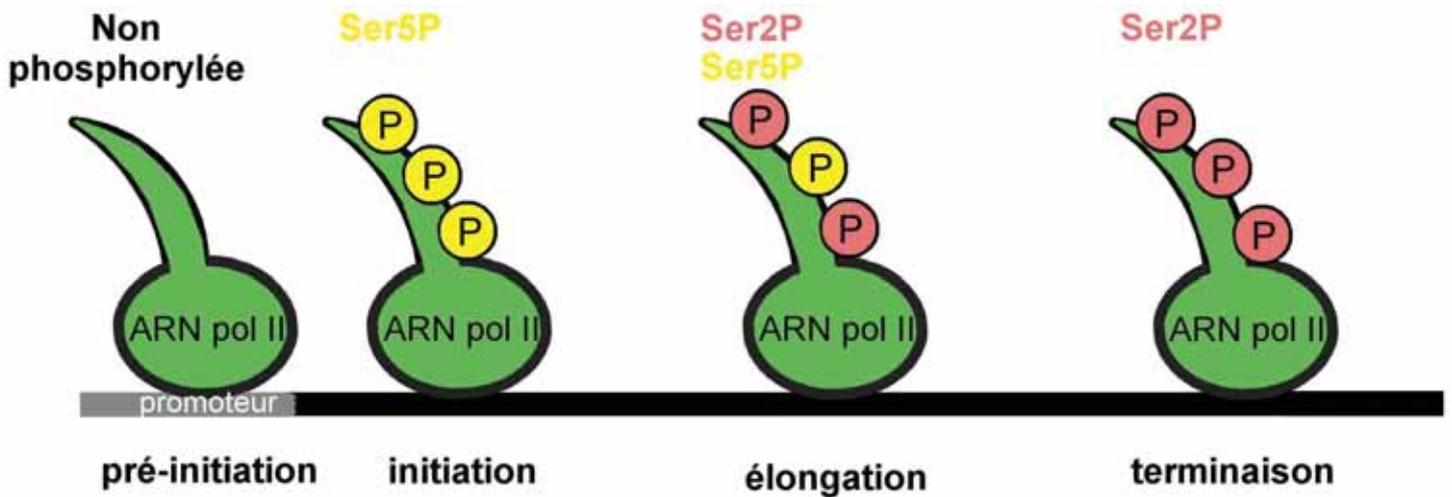


Figure 6 : Profil de phosphorylation du domaine carboxy-terminal de l'ARN pol II le long d'un gène

L'ARN pol II est représentée à quatre positions différentes le long d'un gène et à chacune de ces positions, son domaine carboxy-terminal (CTD) présente un état de phosphorylation particulier. En jaune sont représentés les résidus Ser5 phosphorylés et en rose sont représentés les résidus Ser2 phosphorylés. Il faut noter que ni le nombre exact de résidus phosphorylés ni la position des répétitions au sein desquelles ils se trouvent ne sont connus.

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

de la thréonine 4 (Thr4) (Hsin et al., 2011), ainsi que la méthylation d'un résidu arginine au sein de l'une des répétitions non consensus du CTD (Sims et al., 2011) ont été décrites. Différents états de phosphorylation prédominent à chaque étape du cycle de transcription, chacun liant un groupe de facteurs différents. Ainsi, l'ARN pol II ayant son CTD sous une forme hypophosphorylée est recrutée au complexe de pré-initiation. Des analyses par ChIP ont montré que le CTD des ARN pol II localisées à proximité des promoteurs est majoritairement phosphorylé sur la Ser5. Le CTD des ARN pol II localisées dans des régions plus distales des gènes est quant à lui majoritairement phosphorylé sur la Ser2 (Komarnitsky et al., 2000; O'Brien et al., 1994). En résumé, lorsque la polymérase entre en élongation productive, les niveaux de phosphorylation de la Ser5 diminuent (Komarnitsky et al., 2000) tandis que les niveaux de phosphorylation de la Ser2 augmentent (figure 6). La phosphorylation du CTD sur la Ser5 semble donc associée à l'initiation de la transcription et aux premières étapes de l'élongation, tandis que la phosphorylation de la Ser2 est corrélée avec l'élongation productive des transcrits. Néanmoins, des niveaux faibles de Ser5 phosphorylée (Ser5P) persistent durant l'élongation, indiquant qu'au moins certains des heptapeptides du CTD de l'ARN pol II en phase d'élongation sont phosphorylés sur la Ser2 et sur la Ser5. Par ailleurs, il a été montré que la diminution des niveaux de Ser5P n'est pas liée à la phosphorylation de la Ser2 puisque dans des cellules dans lesquelles la phosphorylation de la Ser2 est bloquée, le niveau de Ser5P n'augmente pas (Cho et al., 2001; Liu et al., 2009; Qiu et al., 2009; Zhou et al., 2009).

De façon intéressante, il a été montré que les histones méthyltransférases Set1 et Set2 interagissent avec le CTD phosphorylé sur la Ser5 et la Ser2 respectivement (Krogan et al., 2003; Ng et al., 2003; Schaft et al., 2003). De même, le complexe élongateur est recruté au niveau des gènes après l'hyperphosphorylation de l'ARN pol II (Metivier et al., 2003). Ces données suggèrent que l'état de phosphorylation du CTD pourrait influencer la structure de la chromatine au cours du cycle de transcription.

La mise en place des différents états de phosphorylation du CTD requiert l'action de kinases et de phosphatases spécifiques. Le CTD est phosphorylé par l'action régulée de kinases dépendantes de cyclines ou CDK (pour Cyclin-Dependent Kinases). Les CDK s'associent avec des cyclines spécifiques et jouent des rôles majeurs dans la régulation de la transcription et du cycle cellulaire (Bregman et al., 2000; Dynlacht, 1997; Murray, 2004). Le CTD est la cible de CDK7, CDK8, CDK9, et CDK12/CDK13 qui sont généralement associées avec les cyclines H, C, T, et K respectivement. L'abondance de ces cyclines ne fluctue pas au cours du cycle cellulaire (Rickert et al., 1996; Tassan et al., 1994). En plus de ces différentes kinases, CDK11 a récemment été impliquée dans la coordination de la transcription avec la maturation des ARN (Hu et al., 2003). Tandis que les CDK présentent un degré de conservation élevé (Lolli et al., 2004; Russo et al., 1996; Tarricone et al., 2001), les cyclines sont moins conservées, et les cyclines impliquées dans la transcription sont très peu apparentées aux cyclines classiques impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Leopold and O'Farrell, 1991; Lew et al., 1991).

II-1) Phosphorylation/déphosphorylation de la Ser5 du CTD

1- Kinases impliquées

La Ser 5 du CTD est la cible de deux kinases, CDK8 que nous aborderons un peu plus loin, et CDK7. La kinase CDK7 avec la Cycline H et la protéine MAT1 (pour Ménage à Trois 1) constituent un sous-complexe du facteur général de transcription TFIIF (Feaver et al., 1994; Roy et al., 1994; Serizawa et al., 1995; Shiekhata et al., 1995). Ce complexe existe également en dehors de TFIIF et est appelé CAK (pour Cyclin Activating Kinase). Au sein du

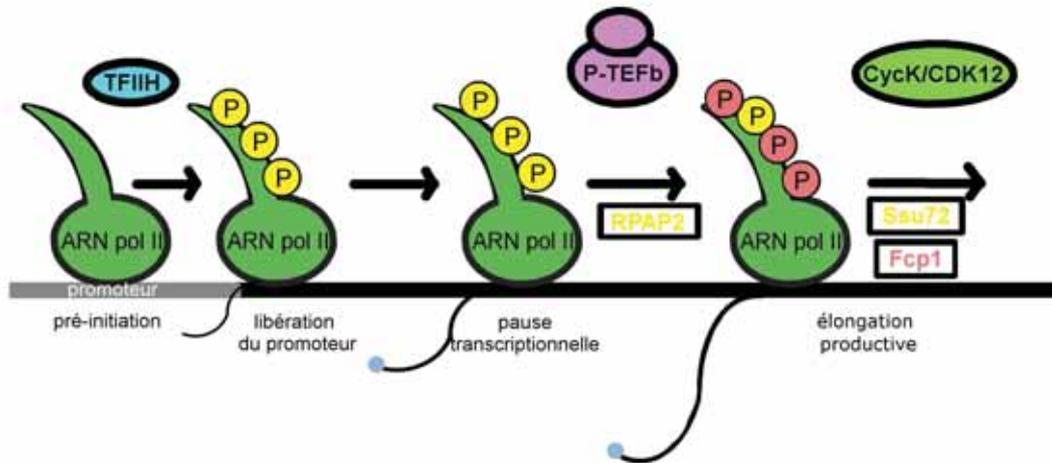


Figure 7 : Phosphatases et kinases impliquées dans l'établissement des différents états de phosphorylation du CTD au cours du cycle de transcription

Au début du cycle de transcription, l'ARN pol II ayant son domaine carboxy-terminal (CTD) sous une forme hypophosphorylée est recrutée au complexe de pré-initiation. Pour faciliter la libération du promoteur et l'initiation, les résidus Ser5 des répétitions heptapeptidiques du CTD sont phosphorylés par CDK7 (un composant du facteur TFIID). Néanmoins, peu après l'initiation, l'ARN pol II entre en pause transcriptionnelle. Cette pause facilite le recrutement des enzymes de « capping » pour permettre l'addition de la coiffe (représentée par un point bleu) à l'ARNm naissant. La kinase CDK9 du facteur positif d'élongation de la transcription, P-TEFb phosphoryle alors les résidus Ser2 des heptapeptides du CTD stimulant ainsi la transition de l'ARN pol II vers une élongation productive. Enfin, la kinase CDK12 du complexe CDK12/CycK phosphoryle les résidus Ser2 des heptapeptides du CTD de l'ARN pol II en cours d'élongation. Cette kinase semble impliquée dans l'augmentation des niveaux de Ser2P vers l'extrémité 3' des gènes.

La phosphatase RPAP2 déphosphoryle les résidus Ser5P au cours de la phase d'élongation précoce, tandis que la phosphatase Ssu72 identifiée chez la levure déphosphoryle les résidus Ser5 encore phosphorylés à l'extrémité 3' des gènes au cours de la terminaison de la transcription. Enfin, la phosphatase Fcp1 déphosphoryle la Ser2P au cours du cycle de transcription et semble jouer un rôle majeur dans le recyclage de l'ARN pol II après que le complexe s'est dissocié de la région codante.

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

complexe CAK, CDK7 phosphoryle les CDK qui contrôlent le cycle cellulaire (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 et CDK6) (Nigg, 1996). Mais au sein du facteur TFIIF, CDK7 est responsable de la phosphorylation de la Ser5 du CTD juste après la formation de la première liaison phosphodiester (figure 7). L'hyperphosphorylation du CTD par CDK7 est nécessaire pour la libération du promoteur. La kinase CDK7 est activée par la cycline H tandis que la protéine MAT1 augmente la spécificité du complexe pour son substrat (Yankulov and Bentley, 1997). L'activité kinase de CDK7 est également régulée par TFIIE, par le Médiateur et par le snARN U1.

En effet, il a été montré que la sous-unité p56 du facteur général de transcription TFIIE était capable de stimuler la phosphorylation du CTD par la kinase du facteur TFIIF (Lu et al., 1992; Ohkuma et al., 1995; Serizawa et al., 1994).

Le Médiateur, quant à lui, se lie à l'ARN pol II dans sa forme non phosphorylée, mais au sein du PIC, il stimule l'activité kinase du complexe TFIIF (Kim et al., 1994). Cette phosphorylation perturbe l'interaction du Médiateur avec l'ARN pol II (Max et al., 2007). La polymérase peut ensuite poursuivre son cycle de transcription, tandis que le Médiateur reste associé au promoteur (Yudkovsky et al., 2000).

Le snARN U1, impliqué dans la reconnaissance du site donneur d'épissage 5', est quant à lui capable de stimuler l'activité kinase de TFIIF via son interaction avec la cycline H (O'Gorman et al., 2005) comme nous le verrons de manière plus détaillée dans le chapitre II.

2- Phosphatases impliquées

Plusieurs phosphatases de la sérine 5 ont été identifiées (figure 7). Ainsi, Ssu72, identifiée chez la levure, est un composant du facteur de clivage et polyadénylation (CPSF) qui possède une activité phosphatase spécifique de la Ser5P (Krishnamurthy et al., 2004; Reyes-Reyes and Hampsey, 2007). Des analyses par ChIP ont révélé que Ssu72 est enrichi de façon prédominante à l'extrémité 3' des gènes, mais aucun enrichissement n'a été détecté au niveau des promoteurs (Ansari and Hampsey, 2005; Nedeá et al., 2003). Il est donc probable qu'une autre protéine soit requise pour la déphosphorylation des Ser5P du CTD lorsque l'ARN Pol II entre en élongation. Ainsi, la protéine RPAP2 humaine, conservée au cours de l'évolution, et se liant à l'ARN pol II, a récemment été identifiée comme la phosphatase de la Ser5P (Egloff et al., 2012; Mosley et al., 2009). Il a été montré que lorsque Rtr1 (l'homologue de RPAP2 chez la levure) est délétée, ou que les niveaux de RPAP2 sont réduits par ARNi dans des cellules humaines, les niveaux de Ser5P restent élevés au cours de l'élongation (Egloff et al., 2012; Mosley et al., 2009). Il est possible que Rtr1/RPAP2 entraîne une réduction du niveau de Ser5P au cours de la phase d'élongation précoce, tandis que Ssu72 déphosphoryle les résidus Ser5P restants en aval au cours de la terminaison de la transcription.

Enfin, une autre phosphatase de la Ser5P appelée Scp1 a été identifiée chez les métazoaires comme étant un répresseur de l'expression génique dans les neurones (Zhang et al., 2006). Il est possible que cette enzyme déphosphoryle les Ser5P du CTD à une étape très précoce avant que l'initiation de la transcription n'ait lieu.

3- Rôle de cette modification

Plusieurs événements sont liés à cette modification. L'un des rôles particulièrement important de la Ser5P est le recrutement de l'enzyme d'ajout de la coiffe. Le CTD est idéalement placé à proximité du canal de sortie de l'ARN pour faciliter cette réaction d'ajout de la coiffe (Cramer et al., 2001; Ghosh et al., 2011). Les enzymes responsables de l'addition de la coiffe, la guanylyltransférase et la méthyltransférase, interagissent directement avec la Ser5P (Cho et al.,

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

1997; Fabrega et al., 2003; Fong and Bentley, 2001; Ho and Shuman, 1999; Komarnitsky et al., 2000; McCracken et al., 1997a; Moteki and Price, 2002; Schroeder et al., 2000). L'inhibition de l'activité kinase de Kin28 (l'homologue de CDK7 chez la levure) en utilisant de petites molécules inhibitrices entraîne une réduction significative des niveaux de Ser5P et de l'ajout de la coiffe en 5' des transcrits naissants (Kanin et al., 2007; Liu et al., 2004). En accord avec ces résultats, la fusion de l'enzyme d'ajout de la coiffe au CTD complémente la mutation perte de fonction de la Ser5 en Alanine chez la levure à fission *S. pombe* (Schwer and Shuman, 2011).

La Ser5P est également impliquée dans le recrutement de certaines enzymes de modification de la chromatine, telles que la méthyltransférase de la lysine 4 de l'histone H3 (Set1) (Ng et al., 2003), ou les complexes histone lysine acetyltransferase (KAT) SAGA (Govind et al., 2007; Pascual-Garcia et al., 2008) et NuA4 qui ont un effet additif sur le désassemblage des nucléosomes et l'élongation de la transcription (Ginsburg et al., 2009). Les Ser5P recrutent également de façon co-transcriptionnelle les histones désacétylases (HDAC) Set3C et Rpd3C(S) (Drouin et al., 2010; Govind et al., 2010).

II-2) Phosphorylation/déphosphorylation de la Ser2 du CTD

1- Kinases impliquées

Les résidus Ser2 du CTD de l'ARN pol II peuvent être phosphorylés par trois kinases différentes : CDK9, CDK12 et CDK8 que nous aborderons dans le paragraphe suivant. La kinase CDK9, sous-unité catalytique du facteur positif d'élongation de la transcription, P-TEFb, intervient précocement au cours de l'élongation en stimulant la transition d'une élongation abortive vers une élongation productive (figure 7) (Cheng and Price, 2007; Marshall and Price, 1995; Renner et al., 2001). Le complexe composé de la cycline K et de CDK12 ou CDK13 cible, quant à lui, l'ARN pol II en cours d'élongation (figure 7) (Bartkowiak et al., 2010). En effet, des analyses par ChIP montrent que, chez la drosophile, dCDK12 est présente sur la région transcrite des gènes actifs. De plus, une diminution des niveaux de CDK12, par ARNi dans des cellules humaines et de drosophile, entraîne une altération de l'état de phosphorylation du CTD. Par contre, en comparaison avec P-TEFb, les niveaux de dCDK12 détectés sont plus faibles à l'extrémité 5' des gènes et plus élevés au milieu et à l'extrémité 3' des gènes (Bartkowiak et al., 2010). Il semble donc que cette kinase soit impliquée dans la phosphorylation du CTD à une étape plus tardive que P-TEFb, augmentant probablement les niveaux de Ser2P vers l'extrémité 3' des gènes.

Comme nous le verrons au chapitre III, la quantité de P-TEFb actif dans la cellule est contrôlée par sa séquestration au sein d'un complexe inactif avec le petit ARN nucléaire 7SK et la protéine HEXIM.

2- Phosphatases impliquées

Fcp1 déphosphoryle la Ser2P, et il a été montré par analyse par ChIP qu'elle co-localise avec l'ARN pol II sur les régions codantes (figure 7) (Cho et al., 2001). De plus, des mutants de Fcp1 entraînent une augmentation du niveau de Ser2P dans les régions codantes des gènes, indiquant que cette phosphatase joue un rôle dans la déphosphorylation de la Ser2P au cours du cycle de transcription (Cho et al., 2001). Fcp1 jouerait également un rôle majeur dans le recyclage de l'ARN pol II après que le complexe s'est dissocié de la région codante (Archambault et al., 1997; Chambers et al., 1995; Cho et al., 1999; Kong et al., 2005).

3- Rôle de cette modification

La phosphorylation de la serine 2 du CTD permet de lever le blocage causé par les facteurs négatifs d'élongation de la transcription. De plus, la phosphorylation de la Ser2 du CTD sert de plateforme pour l'assemblage de complexes voyageant avec l'ARN pol II sur le gène. Ces complexes incluent les facteurs régulant l'élongation de la transcription, la maturation des ARN et la terminaison de la transcription (comme nous le verrons dans le paragraphe III-3), ainsi que des facteurs de modification et de remodelage de la chromatine.

II-3) Rôles de la kinase CDK8

CDK8 est une sérine/thréonine kinase nucléaire qui s'associe à la cycline C et fonctionne comme un régulateur transcriptionnel. Cette kinase peut notamment phosphoryler la Ser2 et la Ser5 du CTD de l'ARN pol II. Le complexe CDK8/CycC s'associe avec MED12 et MED13, pour former le module kinase du médiateur, présent dans une sous-population des complexes Médiateur. De nombreuses études menées chez la levure et chez les métazoaires ont décrit CDK8 comme un co-répresseur de la transcription. Une étude menée chez *S. cerevisiae* suggère notamment que Srb10 (l'homologue de CDK8) peut phosphoryler le CTD de l'ARN pol II avant son recrutement au niveau du promoteur, de sorte que cette phosphorylation trop précoce empêche la formation du complexe de pré-initiation (Hengartner et al., 1998). Chez l'homme, CDK8 peut également réprimer la transcription en phosphorylant la cycline H du complexe TFIIF, ce qui inhibe l'activité kinase de CDK7 (Akoulitchev et al., 2000). CDK8 inhiberait également l'expression de certains gènes en phosphorylant des facteurs de transcription gène-spécifiques, diminuant ainsi leur stabilité et entraînant leur dégradation (Chi et al., 2001; Nelson et al., 2003). Malgré tout, plusieurs études montrent que CDK8 peut aussi avoir un effet positif sur la transcription (Galbraith et al., 2010). Par exemple, diverses voies de signalisation incluant la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Firestein et al., 2008; Morris et al., 2008), la voie de signalisation p53 (Beckerman et al., 2009; Donner et al., 2007a; Donner et al., 2007b), la voie de signalisation TGF β (Alarcon et al., 2009) et la voie de réponse au sérum (Donner et al., 2010) emploient CDK8 comme un co-activateur. De même, CDK8 coopère avec le complexe Médiateur « cœur » pour stimuler l'activation de la transcription dépendante des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (Belakavadi and Fondell, 2010). De plus, il a été montré que Kin28 et Srb10 collaborent pour entraîner la dissociation ATP-dépendante des complexes de pré-initiation en un « scaffold complex » et en un complexe d'élongation précoce, stimulant ainsi la transcription par l'ARN pol II (Liu et al., 2004).

II-4) Rôle gène-spécifique de certaines modifications du CTD

La phosphorylation de la Ser7 du CTD a été détectée sur les gènes codant des protéines et les gènes de snARN transcrits par l'ARN pol II (Chapman et al., 2007; Egloff et al., 2007). Le rôle de cette modification sur les gènes codant des protéines reste mal défini étant donné que la mutation des Ser7 n'affecte pas significativement la production des ARNm à partir de plusieurs gènes analysés (Chapman et al., 2007; Egloff et al., 2007). En revanche, la phosphorylation de la Ser7 est clairement requise pour une transcription efficace des gènes codant des snARN et pour la maturation de ces transcrits (Egloff et al., 2007). La Ser7P joue un rôle important dans le recrutement de l'Intégrateur (un complexe impliqué dans la maturation de l'extrémité 3' des snARN) au niveau des gènes codant les snARN (Baillat et al., 2005; Egloff et al., 2007). Kin28/CDK7 a été identifiée comme la kinase impliquée dans cette modification (Akhtar et al., 2009; Boeing et al., 2010; Glover-Cutter et al., 2009; Kim et al., 2009), tandis que Ssu72 a été identifiée comme la phosphatase de la Ser7P (Bataille et al.,

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

2012; Zhang et al., 2012). En plus de CDK7, la kinase Bur1 semble agir comme une kinase de la Ser7 sur l'ARN pol II en phase d'élongation chez la levure (Tietjen et al., 2010), CDK9 peut phosphoryler la Ser7 *in vitro* (Glover-Cutter et al., 2009; Kim et al., 2009), et la DNA-PK a été identifiée comme la kinase majeure de la Ser7 dans des extraits nucléaires de cellules HeLa (Egloff et al., 2010).

La phosphorylation de la Thr4 du CTD est conservée au cours de l'évolution de la levure à l'Homme (Hsin et al., 2011; Sakurai and Ishihama, 2002) et requiert la kinase CDK9 du complexe P-TEFb. Cette phosphorylation de la Thr4 du CTD est requise spécifiquement pour la maturation de l'extrémité 3' des ARNm d'histones, en facilitant le recrutement des facteurs de maturation de l'extrémité 3' au niveau des gènes codant ces histones (Hsin et al., 2011).

Le résidu Arg1810 situé au sein d'un heptapeptide non consensus du CTD est méthylé par CARM1 (pour coactivator-associated arginine methyltransferase 1). Bien que cette méthylation de l'Arg1810 soit retrouvée sur l'ARN pol II sous sa forme hyperphosphorylée *in vivo*, la phosphorylation des Ser5 et Ser2 inhibe l'activité de CARM1, suggérant que cette méthylation se produit précocement au cours de l'activation transcriptionnelle, avant l'initiation de la transcription (Sims et al., 2011). La méthylation de l'Arg1810 semble jouer un rôle spécifique dans l'expression de divers snARN et snoARN (Sims et al., 2011).

III) Le couplage de la transcription avec la maturation des ARN

Diverses étapes dans la synthèse des ARN, telles que la transcription, la maturation des ARN, et l'export sont physiquement et fonctionnellement couplés. Les facteurs de maturation des ARN sont assemblés et désassemblés sur le complexe d'élongation de la transcription d'une manière coordonnée spatio-temporellement, et le CTD de l'ARN pol II joue un rôle clé dans le couplage de la transcription avec la maturation des ARN. En effet, ce couplage est suggéré par le fait que des délétions du CTD affectent la maturation (McCracken et al., 1997b) dans la plupart des études réalisées jusqu'à aujourd'hui, même si ces effets peuvent varier d'un gène à l'autre (Ryman et al., 2007). Un certain nombre de facteurs impliqués dans l'ajout de la coiffe, l'épissage et la maturation en 3' des ARN interagissent spécifiquement avec le CTD en fonction de son état de phosphorylation. Le cycle de phosphorylation du CTD faciliterait ainsi diverses réactions biochimiques au moment opportun au cours du cycle de transcription.

III-1) Ajout de la coiffe (ou « capping »)

Les pré-ARN messagers sont modifiés à leur extrémité 5' par l'addition d'une coiffe 7-méthyl G5'ppp5'N lorsque la taille du transcrit naissant atteint entre 25 et 50 nucléotides. L'ajout de la coiffe est un processus qui ne requiert pas de séquence spécifique dans l'ARN. Dans un premier temps, une ARN triphosphatase élimine le phosphate γ du premier nucléotide de l'ARN naissant. Ensuite, un GMP est ajouté par l'ARN guanylyltransférase. Enfin, la guanine est méthylée sur son N7. Chez les métazoaires, l'une des enzymes impliquées dans l'ajout de la coiffe (enzyme de « capping ») est un polypeptide bi-fonctionnel possédant les activités triphosphatase et guanylyltransférase. Le « capping » est mené par l'action concertée de la guanylyltransférase et de la méthyltransférase. Bien que ces deux enzymes ne s'associent pas, elles se lient toutes les deux spécifiquement et directement au CTD de l'ARN pol II phosphorylé sur la Ser5 (Shuman, 2001). Quand la transcription est initiée, la phosphorylation du CTD sur la Ser5 permet le recrutement des enzymes de « capping » sur le complexe d'élongation de la transcription. L'interaction spécifique entre la Ser5P du CTD et la guanylyltransférase permet l'activation allostérique de son activité catalytique (Ho and Shuman, 1999). Il a été montré que Spt5, la grande sous-unité de DSIF, interagit aussi avec la guanylyltransférase et active allostériquement son activité. L'addition de la coiffe est donc

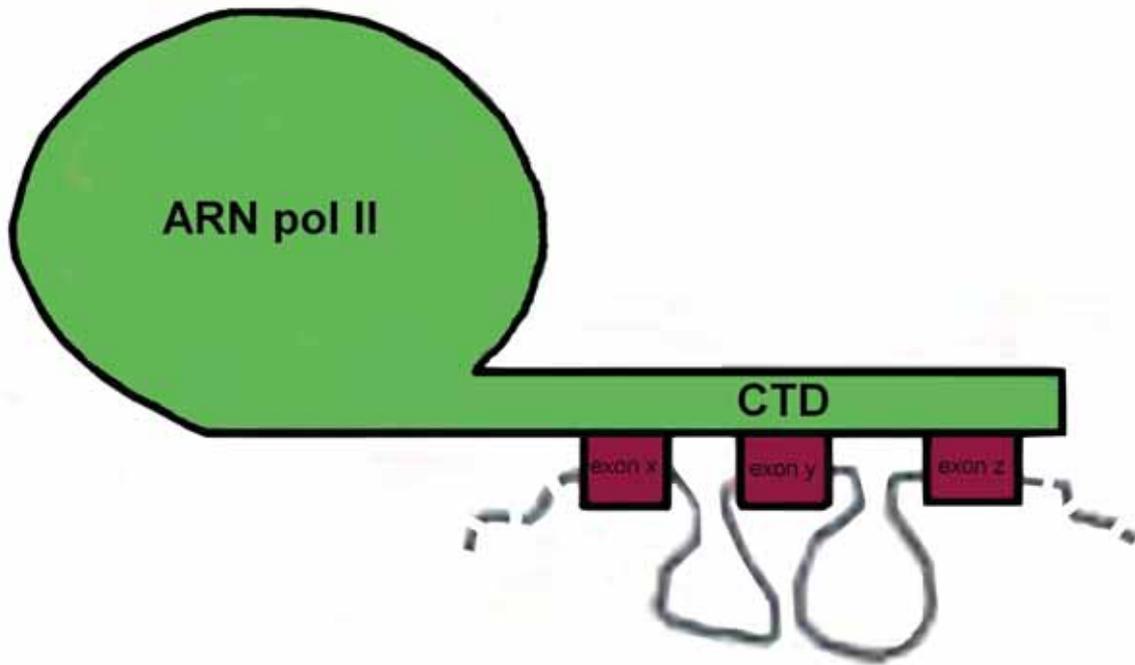


Figure 8 : Modèle de couplage entre épissage et transcription par l'ARN pol II (d'après Kornbliht et al, 2004)

Modèle dans lequel le CTD de l'ARN pol II immobiliserait les exons consécutifs nouvellement synthétisés, facilitant ainsi leur juxtaposition et donc l'épissage.

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

facilitée par la co-localisation des enzymes de « capping » sur le CTD phosphorylé et l'activation allostérique de l'activité guanylyltransférase.

Il a été montré *in vitro* que la pause transcriptionnelle imposée par NELF et DSIF peut être levée par l'ajout des enzymes de « capping » aux réactions de transcription (Mandal et al., 2004). Ces résultats suggèrent que le recrutement des enzymes de « capping » joue un rôle critique de point de contrôle durant la transition en élongation productive (Mandal et al., 2004). Des données plus récentes soutiennent ce modèle de point de contrôle permettant de s'assurer que des transcrits non coiffés ne sont pas allongés. En effet, une étude a montré que la délétion de la méthyltransférase impliquée dans le « capping », chez la levure à fission, compromet l'activité de CDK9-Pchl, entraînant un blocage de l'ARN pol II en pause (Guiguen et al., 2007). Néanmoins, l'inactivation de Kin28 (l'homologue de CDK7 chez la levure) n'affecte significativement ni les niveaux d'ARNm à l'équilibre, ni l'initiation de la transcription au gène inductible *GALI* (Hong et al., 2009; Kanin et al., 2007). Ces résultats suggèrent que l'inactivation de Kin28 n'affecte pas globalement la transcription. Néanmoins, il est important de noter que ces études se focalisent sur une inhibition chimique de Kin28 et que ce type d'inhibition peut ne pas être totale à cause de la liaison à l'équilibre de ces petites molécules à la kinase; il est possible que de très faibles niveaux de phosphorylation de la Ser5, soit par Srb10 (l'homologue de CDK8 chez la levure) soit par l'activité résiduelle de Kin28, suffisent pour l'initiation de la transcription. De façon importante, l'inhibition chimique de Kin28 et Srb10 entraîne une diminution de l'occupation des régions distales du gène par l'ARN pol II, supportant le modèle dans lequel la Ser5P pourrait aider à la libération du promoteur (Tietjen et al., 2010).

De façon intéressante, il a été montré que la phosphatase du CTD Fcp1 est requise pour que les enzymes de « capping » soient relarguées des complexes d'élongation de la transcription *in vivo* (Komarnitsky et al., 2000; Schroeder et al., 2000). Une régulation temporelle et spatiale de la phosphorylation et de la déphosphorylation du CTD de l'ARN pol II est donc cruciale pour le couplage de l'ajout de la coiffe en 5' et de la transcription précoce.

III-2) Épissage

Le processus d'élimination des introns et de ligation des exons, appelé épissage, est réalisé par la machinerie d'épissage (ou « spliceosome »), un complexe comprenant les petits ARN nucléaires (snARN) U1, U2, U4, U5 et U6 assemblés stablement avec des protéines spécifiques pour former des petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires (snRNP). L'épissage nécessite également l'intervention d'autres facteurs d'épissage essentiels tels que les protéines SR. Ces protéines se lient sur des séquences spécifiques situées au sein des exons (appelées ESE) et jouent un rôle clé dans la reconnaissance des signaux d'épissage et dans l'assemblage du spliceosome. De nombreuses études ont montré que l'épissage est étroitement lié à la transcription et que de nombreux introns, sont excisés co-transcriptionnellement, tandis que le transcrit naissant est encore associé au gène (Kornblihtt et al., 2004). En effet, il a notamment été montré que le CTD de l'ARN pol II est requis pour un épissage efficace (de la Mata and Kornblihtt, 2006; Fong and Bentley, 2001; Hirose et al., 1999; McCracken et al., 1997b; Misteli and Spector, 1999; Zeng and Berget, 2000). Une étude suggère que le CTD de l'ARN pol II pourrait, d'une certaine manière, immobiliser les exons consécutifs nouvellement synthétisés, facilitant ainsi leur juxtaposition et donc l'épissage (figure 8) (Dye et al., 2006). Des études ont également montré que plusieurs protéines SR se lient préférentiellement au CTD phosphorylé (Chabot et al., 1995; Kim et al., 1997; Mortillaro et al., 1996; Vincent et al., 1996). Ainsi, il est possible que les protéines SR pré-chargées sur le CTD se lient au transcrit naissant dès lors que le site d'épissage 5' et les séquences ESE émergent de la polymérase. Enfin, il a été montré que le CTD est requis pour

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre I : La transcription par l'ARN polymérase II

permettre l'effet d'une protéine SR sur l'inclusion d'un exon alternatif (de la Mata and Kornblihtt, 2006).

Un autre type de couplage entre transcription et épissage est lié à la vitesse d'élongation de la transcription. En effet, le patron d'épissage peut être influencé par une modulation de la vitesse d'élongation de l'ARN pol II, de sorte qu'une élongation lente favorise l'utilisation d'un site d'épissage faible situé en amont d'un site d'épissage plus fort (de la Mata et al., 2003; Howe et al., 2003; Ip et al., 2011; Munoz et al., 2009; Roberts et al., 1998).

Tout comme la transcription influence l'épissage, l'épissage influence également la transcription. Plusieurs études ont montré que la transcription de gènes codant des transcrits présentant des défauts d'épissage est réduite (Damgaard et al., 2008; Eberle et al., 2010; Furger et al., 2002). Par ailleurs, la délétion du facteur d'épissage SC35, induit une atténuation de l'élongation de la transcription de manière gène-spécifique (Lin et al., 2008).

Enfin, une pause marquée par l'ARN pol II à l'extrémité 3' des introns a récemment été mise en évidence chez la levure (Alexander et al., 2010). Ce processus pourrait permettre le contrôle de la fidélité de l'épissage co-transcriptionnel des pré-ARNm.

III-3) Maturation en 3'

La maturation en 3' de la plupart des ARNm est fonctionnellement couplée à la terminaison de la transcription. Il a ainsi été montré que certains des facteurs de la machinerie de maturation en 3' se lient directement au CTD (Kim et al., 2004; Lunde et al., 2010; Meinhart et al., 2005; Phatnani and Greenleaf, 2006), et que ce dernier stimule le clivage et la polyadénylation *in vivo* et *in vitro* (Hirose and Manley, 2000; McCracken et al., 1997b). Le facteur de clivage et polyadénylation Pcf11 se lie préférentiellement sur le CTD phosphorylé sur la Ser2 (Ahn et al., 2004; Licatalosi et al., 2002; Lunde et al., 2010; Meinhart and Cramer, 2004). La modulation de la phosphorylation du CTD tandis que l'ARN pol II transcrit le gène aide donc à coordonner l'assemblage de la machinerie de clivage et polyadénylation au site de transcription.

Chapitre II : Les ARN non codants impliqués dans la régulation de la transcription

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre I, la transcription, qui représente la première étape de l'expression génique, est un processus extrêmement régulé chez tous les organismes. Pendant de nombreuses années, les facteurs régulant la transcription ont été considérés comme étant uniquement des protéines. Néanmoins, plus récemment, de nombreux ARN jouant un rôle dans le contrôle de la transcription ont été décrits. Ces ARN régulateurs transcriptionnels font partie d'une classe d'ARN appelés ARN non codants (ARNnc) puisqu'ils ne présentent pas de cadre ouvert de lecture (ORF) codant des protéines. Des ARNnc régulant la transcription ont été découverts chez de nombreux organismes allant de la bactérie à l'Homme. Dans ce chapitre nous allons plus particulièrement nous intéresser à certains de ces ARN qui contrôlent la transcription par divers mécanismes et à divers niveaux. Ainsi, l'ARN 6S chez la bactérie, tout comme l'ARN B2 chez la souris et l'ARN Alu chez l'Homme ciblent directement l'ARN polymérase. Le snARN 7SK, le snARN U1 et l'ARN DHFR se lient, quant à eux, à des facteurs de transcription et régulent leur activité. Tandis que, l'ARN SRA et l'ARN HSR1 se lient à des co-activateurs ou activateurs transcriptionnels et contrôlent leur activité. Enfin, les ARN HOTAIR, Xist et Tsix, et roX facilitent les modifications de la chromatine. La liste des ARNnc décrits dans ce chapitre est loin d'être exhaustive, mais elle donne un aperçu de la diversité des fonctions jouées par les ARNnc dans la régulation de la transcription. Par ailleurs, des rôles dans d'autres processus cellulaires ont été décrits pour certains de ces ARNnc, mais seule leur fonction dans la régulation de la transcription sera abordée dans ce chapitre.

I- Les ARNnc ciblant directement l'ARN polymérase

Les ARN non codants décrits dans ce paragraphe ciblent directement l'ARN polymérase, élément central de la machinerie de transcription. Ils ont donc le potentiel de contrôler la transcription de nombreux gènes au sein du génome. En effet, bien que ces ARNnc soient issus d'organismes aussi distants que la bactérie et l'Homme, ils agissent tous en *trans* comme des facteurs répresseurs de l'ARN polymérase et régulent globalement la transcription en réponse à des changements des conditions cellulaires.

I-1) L'ARN 6S chez les bactéries

Chez les procaryotes, il n'existe qu'un seul type d'ARN polymérase. L'ARN polymérase bactérienne est composée d'un complexe cœur, transcriptionnellement actif, constitué de deux sous-unités α , une sous-unité β , une sous-unité β' , et une sous-unité ω . Ce complexe cœur s'associe avec une sous-unité σ , formant ainsi l'holoenzyme. La sous-unité σ dirige la reconnaissance des promoteurs et est requise pour l'initiation de la transcription et l'ouverture du promoteur (Fenton et al., 2000; Roberts and Roberts, 1996). Après l'initiation, la poursuite de la transcription nécessite des ré-arrangements au sein de la polymérase, qui s'accompagnent du détachement de la sous-unité σ (Mooney and Landick, 1999). Le facteur σ prédominant chez la bactérie est σ^{70} .

L'ARN 6S est un ARNnc très abondant, décrit pour la première fois chez *E. coli* (Hindley, 1967). Des homologues de l'ARN 6S ont ensuite été découverts chez la plupart des espèces bactériennes (Barrick et al., 2005; Trotochaud and Wassarman, 2005). Chez *E. coli*, cet ARN de 184 nucléotides s'accumule au cours de la croissance, atteignant un niveau maximal plusieurs heures après la transition en phase stationnaire (Wassarman and Storz, 2000).

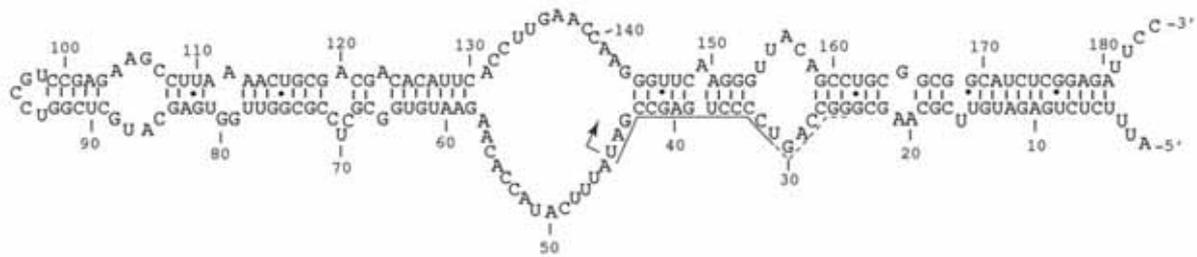


Figure 9 : Structure secondaire de l'ARN 6S de *E. coli* (d'après Wassarman, 2007)

La flèche représente le site d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase $E\sigma^{70}$ et la séquence soulignée indique la région de l'ARN 6S complémentaire au produit ARN (pARN).

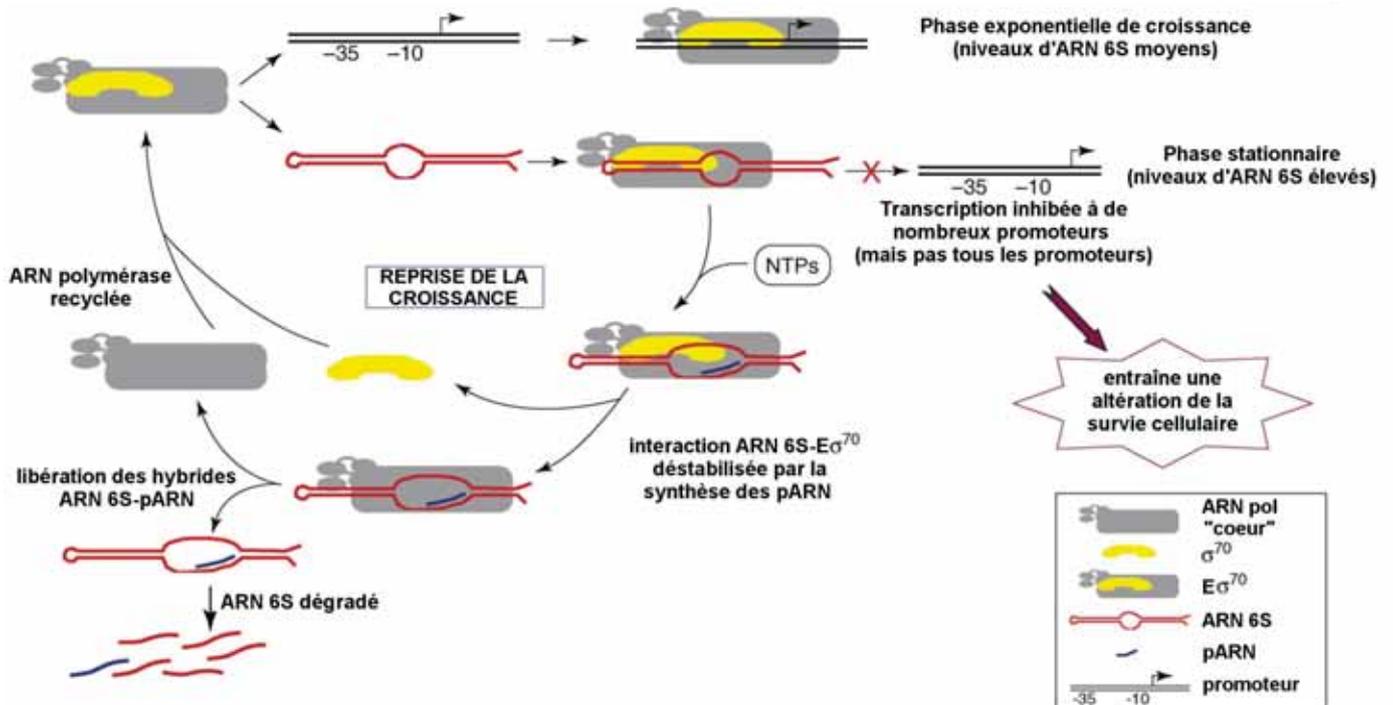


Figure 10 : Modèle pour l'interaction dynamique entre l'ARN 6S, le promoteur et l'ARN polymérase $E\sigma^{70}$ au cours des différentes phases de croissance (tiré de Wassarman, 2007)

L'ARN 6S et le promoteur sont en compétition directe pour la liaison à l'ARN polymérase $E\sigma^{70}$. Au cours de la phase stationnaire, les niveaux d'ARN 6S sont élevés et le complexe ARN 6S- $E\sigma^{70}$ prédomine. L'inhibition de la transcription par l'ARN 6S entraîne une altération de la survie cellulaire : une augmentation de la survie à long terme et une diminution de la survie face à des conditions de stress en phase stationnaire. Lorsque des cellules en phase stationnaire sont transférées dans un milieu riche en nutriment, elles entrent dans une phase de reprise de croissance au cours de laquelle l'ARN 6S est utilisé comme matrice pour la synthèse des pARN, entraînant la libération et la diminution des niveaux d'ARN 6S ainsi que le recyclage des ARN polymérases $E\sigma^{70}$.

L'ARN 6S se lie étroitement à l'holoenzyme contenant le facteur σ^{70} ($E\sigma^{70}$), mais ne se lie pas avec l'enzyme cœur, les holoenzymes contenant d'autres sous-unités σ , ou la sous-unité σ^{70} libre (Trotochaud and Wassarman, 2005; Wassarman and Storz, 2000). Au cours de la phase exponentielle de croissance et de la transition en phase stationnaire, au moins 90% de l'ARN 6S est lié aux $E\sigma^{70}$; en phase stationnaire tardive, lorsque les niveaux d'ARN 6S sont maximaux, la vaste majorité des $E\sigma^{70}$ est donc en complexe avec l'ARN 6S (Wassarman and Storz, 2000). La structure secondaire de l'ARN 6S est particulièrement conservée entre différentes espèces bactériennes (Barrick et al., 2005; Trotochaud and Wassarman, 2005) et est requise pour son interaction avec l' $E\sigma^{70}$ (Trotochaud and Wassarman, 2005). L'ARN 6S est majoritairement double brin avec une large boucle simple brin au centre s'étendant sur 10 à 15 nucléotides (figure 9). Cette structure secondaire rappelle la conformation de l'ADN au sein du « complexe ouvert » au cours de l'initiation de la transcription (Barrick et al., 2005). Cette structure dirige donc la liaison de l'ARN 6S dans le site actif de $E\sigma^{70}$ de façon similaire à l'interaction entre l'ADN d'un promoteur et $E\sigma^{70}$. L'ARN 6S empêche ainsi la liaison de $E\sigma^{70}$ à l'ADN, entraînant une répression de l'expression de centaines de gènes transcrits par $E\sigma^{70}$ (figure 10) (Cavanagh et al., 2008; Trotochaud and Wassarman, 2005; Wassarman and Saecker, 2006; Wassarman and Storz, 2000). L'ARN 6S est engagé activement dans le site actif de la polymérase, puisque cet ARN peut être utilisé comme matrice pour la synthèse de courts transcrits (14 à 20 nucléotides). Ces transcrits, appelés pARN (pour produit ARN), sont initiés à partir d'un site spécifique situé au sein de la large boucle retrouvée dans la structure secondaire de l'ARN 6S (Gildehaus et al., 2007; Wassarman and Saecker, 2006; Wurm et al., 2010). Les pARN ainsi produits peuvent former des hybrides avec l'ARN 6S. Ces hybrides pARN/ARN 6S ont été détectés dans des cellules ayant été diluées dans du milieu frais après être arrivées en phase stationnaire (Wassarman and Saecker, 2006). Au cours de la reprise de la croissance, la synthèse de ces pARN entraîne une libération rapide des holoenzymes $E\sigma^{70}$ des ARN 6S et les niveaux d'ARN 6S diminuent (Cavanagh et al., 2011; Wassarman and Saecker, 2006; Wurm et al., 2010). En effet, la répression de $E\sigma^{70}$ est détrimentaire pour une reprise de la croissance efficace. La synthèse des pARN est donc un mécanisme important à cette étape, pour libérer les ARN polymérases $E\sigma^{70}$ de l'inhibition par l'ARN 6S, et ainsi permettre la dé-répression de la transcription (Cavanagh et al., 2011).

Tandis que les cellules n'ayant pas d'ARN 6S sont viables et ne présentent pas de défaut de croissance évident (Lee et al., 1985), l'ARN 6S est requis pour une survie optimale des cellules maintenues pendant de longues périodes (> de 20 jours) dans des conditions appauvries en nutriment (Trotochaud and Wassarman, 2004; Wassarman and Saecker, 2006). Néanmoins, une analyse plus détaillée dans différentes conditions de croissance a révélé que des cellules dépourvues d'ARN 6S survivent mieux que des cellules sauvages au cours de la phase stationnaire lorsqu'elles sont exposées à divers types de stress (Trotochaud and Wassarman, 2006). Ces résultats suggèrent que l'ARN 6S pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'utilisation des nutriments se raréfiant au cours d'une phase stationnaire longue, en partie en limitant la réponse au stress pour conserver l'énergie (Trotochaud and Wassarman, 2006). Un tel modèle suggère qu'il existe un compromis entre la capacité à répondre pleinement au stress à court terme et la capacité à survivre à une limitation en nutriments à long terme. La régulation de la transcription par l'ARN 6S entraîne donc une augmentation de la survie à long terme mais diminue la survie en condition de stress au cours de la phase stationnaire.

I-2) L'ARN B2 chez la souris et les ARN Alu chez l'Homme

Les SINE (pour Short Interspersed Element) B2 de souris et Alu humain sont des rétrotransposons très abondants avec respectivement environ 350 000 copies dispersées au

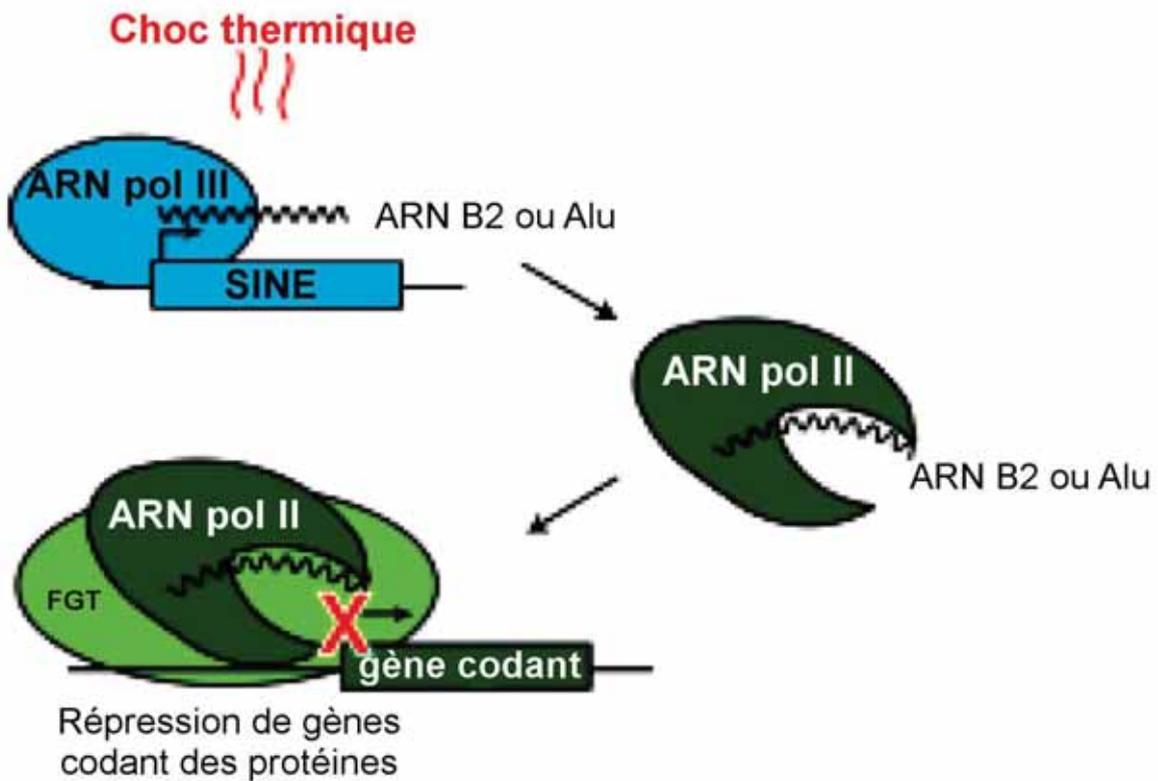


Figure 11 : Les ARN B2 des souris et Alu humain sont des répresseurs de la transcription par l'ARN pol II (tiré de Goodrich and Kugel, 2010)

Le niveau de ces ARNnc, synthétisés par l'ARN pol III à partir d'éléments SINE, augmente à la suite d'un choc thermique. Les ARN B2 et Alu se lient à l'ARN pol II et répriment la transcription de certains gènes codant des protéines. Ces ARNnc s'incorporent avec l'ARN pol II et les facteurs généraux de transcription (FGT) au sein des complexes d'initiation au niveau des promoteurs.

sein du génome de la souris et environ 1 000 000 de copies dispersées dans le génome humain. Les ARN B2 et Alu peuvent être synthétisés soit par l'ARN polymérase III comme des transcrits distincts, soit au sein d'un ARN synthétisé par l'ARN pol II en fonction de leur lieu d'insertion dans le génome. Les ARN B2 et Alu synthétisés par l'ARN pol III, font respectivement environ 180 nucléotides et 280 nucléotides. L'ARN B2 et l'ARN Alu s'accumulent dans les cellules à la suite de divers stress, tels que les choc thermique, et fonctionnent comme des répresseurs de la transcription par l'ARN pol II (Allen et al., 2004; Fornace and Mitchell, 1986; Li et al., 1999; Liu et al., 1995; Panning and Smiley, 1994; Rudin and Thompson, 2001). Cette répression est liée à une interaction directe entre ces ARN et l'ARN pol II (Espinoza et al., 2004; Mariner et al., 2008), qui empêche le contact entre l'ARN pol II et le promoteur (Mariner et al., 2008; Yakovchuk et al., 2009). Malgré l'absence de contact entre le promoteur et l'ARN pol II en présence des ARN B2 ou Alu, l'assemblage des complexes de pré-initiation au niveau des promoteurs n'est pas bloqué. En effet, les ARN B2 et Alu entrent avec l'ARN pol II dans les complexes de pré-initiation sur les promoteurs des gènes (figure 11) (Espinoza et al., 2004; Espinoza et al., 2007). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les facteurs généraux de transcription créent un réseau d'interactions qui maintient les complexes de pré-initiation sur les promoteurs même en l'absence d'interaction entre l'ARN pol II et le promoteur. Des analyses par CHIP ont montré qu'en réponse à un choc thermique, dans des cellules humaines et dans des cellules murines, l'occupation par l'ARN pol II des promoteurs des gènes réprimés augmente, tandis que l'occupation par l'ARN pol II décroît simultanément dans les régions situées en aval des promoteurs. Ces analyses montrent que les promoteurs des gènes réprimés en réponse aux chocs thermiques sont occupés par les ARN B2 et Alu, tandis que le promoteur du gène *hsp70*, qui est lui activé en réponse aux chocs thermiques, ne l'est pas (Mariner et al., 2008). Ces données suggèrent que les ARN Alu et B2, en réponse aux chocs thermiques, répriment la transcription en *trans* en s'assemblant avec l'ARN pol II aux promoteurs des gènes réprimés. Néanmoins, on ne sait pas comment les gènes de réponse aux chocs thermiques, tels que *hsp70*, qui sont eux activés en réponse aux choc thermique, sont protégés de la répression par les ARN B2 et Alu, ni comment la répression des autres gènes est levée lorsque les cellules se rétablissent après un choc thermique. Par ailleurs, l'ARN B2 semble jouer un autre rôle dans la répression de la transcription en réponse à un choc thermique. En effet, après un choc thermique, la phosphorylation de la Ser5 du CTD diminue nettement au promoteur de gènes réprimés, et ce malgré la présence continue du facteur général de transcription TFIIF (Yakovchuk et al., 2011). La phosphorylation de la Ser5 par TFIIF est inhibée par l'ARN B2 lorsqu'il est assemblé au sein des complexes de pré-initiation (Yakovchuk et al., 2011).

En résumé, les mécanismes d'action par lesquels les ARN Alu et B2 de mammifère et l'ARN bactérien 6S répriment la transcription présentent de grandes similarités. En effet, les ARN B2, Alu et 6S se lient tous directement à l'ARN polymérase, bloquent sa capacité à s'associer correctement avec le promoteur, et ainsi répriment la transcription. De plus, ces trois ARNnc agissent comme des répresseurs généraux de la transcription en réponse à des conditions cellulaires spécifiques.

II- Les ARNnc ciblant des facteurs de transcription

Les ARNnc décrits dans ce paragraphe régulent des composants de la machinerie de transcription générale ; ils ont donc le potentiel de réguler la transcription de la quasi totalité

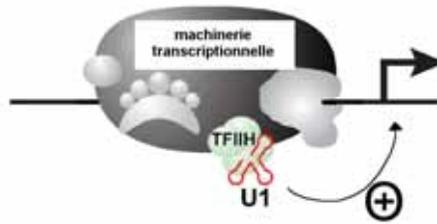


Figure 12 : Association du snARN U1 avec TFIIF

L'association du snARN U1 avec TFIIF augmente considérablement ses activités kinase et hélicase qui sont essentielles pour l'initiation de la transcription, la libération du promoteur et les étapes précoces de l'élongation de la transcription.

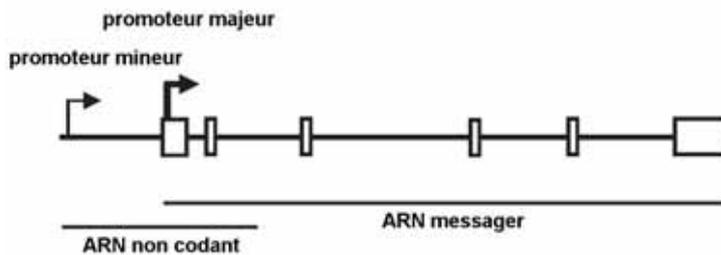


Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation du promoteur du gène DHFR humain.

Le transcrit non codant produit à partir du promoteur mineur et l'ARNm DHFR produit à partir du promoteur majeur sont représentés (les boîtes représentent les exons).

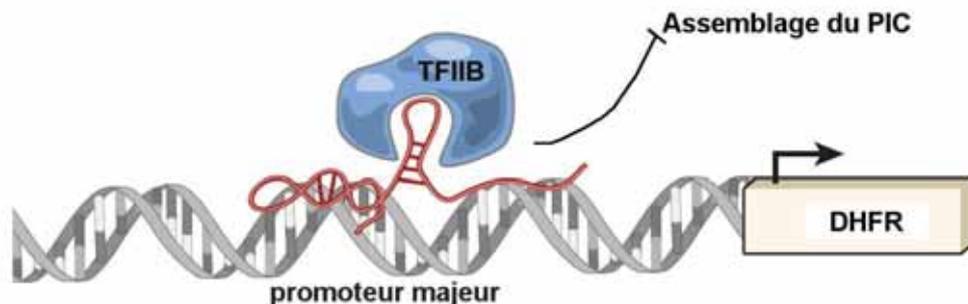


Figure 14 : Mode d'action de l'ARNnc DHFR

L'ARNnc DHFR inhibe l'expression de l'ARNm DHFR en *cis* et en *trans* en formant un triplex ARN-ADN avec le promoteur majeur DHFR et en interagissant directement avec TFIIB, ce qui interfère avec l'assemblage des complexes de pré-initiation au niveau de ce promoteur.

des gènes, comme c'est le cas des snARN U1 et 7SK, ou de fonctionner de manière gène-spécifique, comme c'est le cas de l'ARN DHFR, en ciblant un facteur général de transcription seulement au niveau de certains promoteurs.

II-1) Le snARN U1

Le snARN U1 est un ARNnc de 164 nucléotides chez l'Homme qui fait partie de la machinerie d'épissage. Cet ARN s'associe spécifiquement et directement à la sous-unité cycline H du facteur général de transcription TFIID (Kwek et al., 2002). L'association du snARN U1 avec TFIID augmente considérablement ses activités kinase et hélicase qui sont essentielles pour l'initiation de la transcription (figure 12), la libération du promoteur et les étapes précoces de l'élongation de la transcription (Kwek et al., 2002; O'Gorman et al., 2005). Ainsi, *in vitro* le snARN U1 stimule l'initiation de la transcription par l'ARN pol II, tandis que la perte de l'association du snARN U1 avec TFIID diminue fortement sa capacité à promouvoir la ré-initiation de la transcription (Kwek et al., 2002). Malgré le fait qu'une étude ait permis d'identifier les éléments du snARN U1 et de TFIID impliqués dans cette interaction (O'Gorman et al., 2005), la manière dont cette association module l'activité de TFIID reste incertaine. De plus, le rôle précis joué par cet ARN sur la transcription globale *in vivo* reste peu étudié.

II-2) Le snARN 7SK

Le snARN 7SK est un ARNnc abondant de 331 nucléotides, qui est synthétisé par l'ARN pol III. Ce snARN régule l'élongation de la transcription par l'ARN pol II en contrôlant la disponibilité du facteur général de transcription P-TEFb. En effet, le complexe P-TEFb composé de la kinase CDK9 et de la cycline T, contrôle le passage de l'ARN pol II en élongation productive en libérant l'ARN pol II de la pause transcriptionnelle à proximité du promoteur. En coopération avec les protéines HEXIM, le snARN 7SK régule négativement l'activité kinase de P-TEFb en le séquestrant au sein de la petite ribonucléoparticule nucléaire 7SK (snRNP 7SK) (Michels et al., 2004; Yik et al., 2003). L'association de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK est dynamique et réversible. Ce snARN régule donc la quantité de P-TEFb disponible dans les cellules en contrôlant l'équilibre entre formes active et inactive de P-TEFb. Cet équilibre est considéré comme important pour la croissance et la viabilité des cellules (Peterlin and Price, 2006; Zhou and Yik, 2006). Nous verrons de manière plus détaillée ce système de régulation de P-TEFb dans le chapitre suivant qui sera entièrement consacré au snARN 7SK et à la régulation de l'activité kinase du facteur P-TEFb.

II-3) L'ARN DHFR

Le gène codant pour la dihydrofolate reductase (DHFR) contient un promoteur mineur et un promoteur majeur (Blume et al., 2003; Masters and Attardi, 1985). Le promoteur majeur, situé en aval du promoteur mineur, dirige la synthèse de l'ARNm DHFR, tandis que le promoteur mineur dirige la synthèse d'un long ARNnc (figure 13). Dans des cellules quiescentes, la synthèse d'ARNm DHFR est réprimée (Hendrickson et al., 1980; Martianov et al., 2007), tandis que les ARNnc DHFR s'accumulent (Blume et al., 2003). Ainsi, dans ces cellules, le mécanisme de répression transcriptionnelle du promoteur majeur dirigeant la synthèse de l'ARNm DHFR dépend de l'ARNnc DHFR. Cet ARNnc inhibe l'expression de DHFR *in cis* et *in trans* en formant un triplex ARN-ADN avec le promoteur majeur DHFR et en interagissant directement avec TFIIB, ce qui interfère avec l'assemblage des complexes de pré-initiation au niveau de ce promoteur (figure 14) (Blume et al., 2003; Martianov et al.,

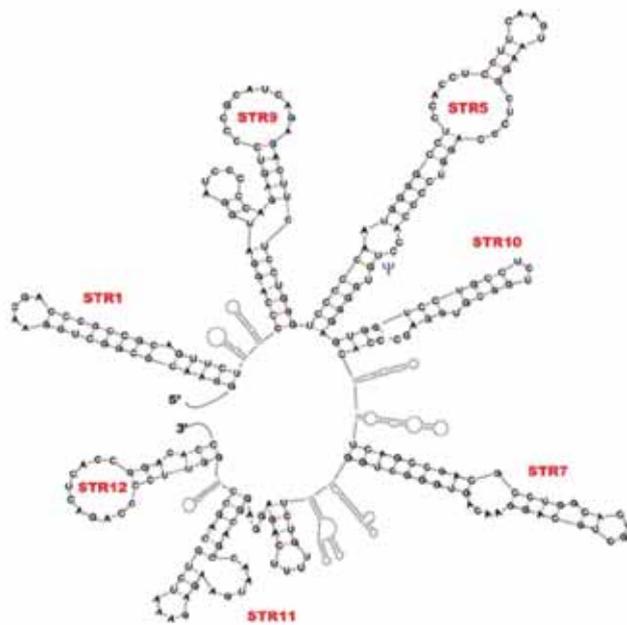


Figure 15 : Représentation schématique de la structure secondaire prédite de l'ARN SRA humain (d'après Leygue, 2007)

La position de l'uridine 207 dans la structure en tige-boucle STR5, identifiée comme un site de pseudouridylation, est indiquée par un ψ .

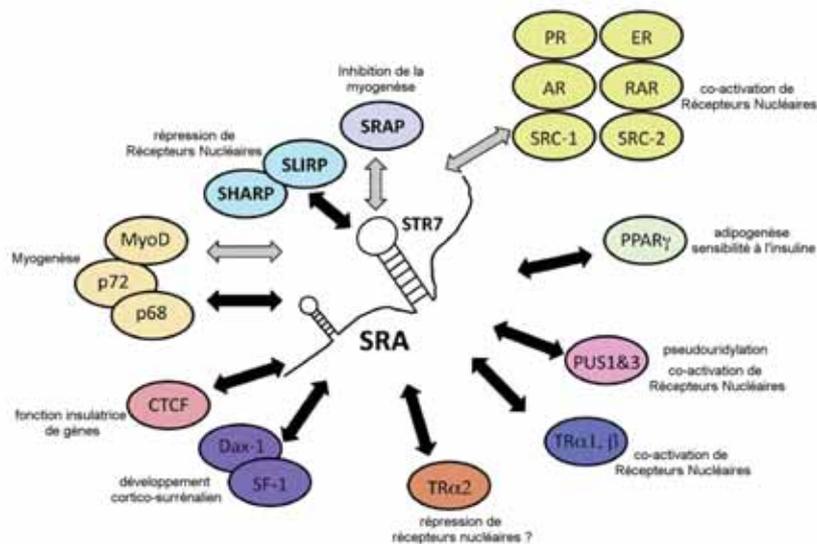


Figure 16 : L'ARNnc SRA et ses partenaires protéiques (d'après Colley and Leedman, 2011)

Les interactions directes (flèches noires) et indirectes (flèches grises) de l'ARNnc SRA avec ses divers partenaires protéiques produit un panel de conséquences allant de la co-activation et la répression de récepteurs nucléaires, des effets négatifs et positifs sur l'adipogenèse et la myogenèse, l'activation de la fonction insulatrice de certaines protéines, à la régulation de gènes impliqués dans le développement des glandes surrénales. SLIRP et SHARP se lieent directement à la structure STR7 de l'ARN SRA, tandis que SRAP s'y lie indirectement. Les sites de liaison des autres partenaires protéiques de SRA n'ont pas été déterminés.

2007). La formation de ce triplex sur le promoteur majeur pourrait faciliter le ciblage et la répression transcriptionnelle de ce promoteur dans les cellules quiescentes.

III- Les ARN co-régulant la transcription

La régulation de la transcription des gènes est très complexe. En effet, comme nous l'avons évoqué, de nombreuses protéines régulatrices, activatrices et répressives, qui se lient aux promoteurs des gènes de manière séquence-spécifique interviennent dans le contrôle transcriptionnel. Ces protéines régulatrices font partie de complexes composés de plusieurs protéines. Les protéines régulatrices qui ne se lient pas directement sur l'ADN mais s'assemblent avec d'autres protéines régulatrices liées à l'ADN sont appelées co-activateurs ou co-répresseurs. Les ARNnc décrits dans ce paragraphe ciblent des protéines régulatrices ou co-régulatrices et contrôlent la transcription en utilisant divers mécanismes.

III-1) L'ARN SRA

De façon surprenante, les produits du gène *SRA* (pour steroid receptor RNA activator) incluent des ARN codant et non codant. L'épissage alternatif du premier intron de l'ARN *SRA*, dont la rétention décale le cadre ouvert de lecture (Hube et al., 2006), est à l'origine de la production de l'ARNnc *SRA* ou de la protéine *SRAP*.

L'ARNnc *SRA* est un ARN de 0,87 Kb, impliqué dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes. En effet, de nombreuses molécules incluant des facteurs de transcription, des récepteurs nucléaires, des co-activateurs de récepteurs nucléaires, des hélicases ARN ou encore des protéines insulatrices se lient directement ou indirectement à l'ARN *SRA* au niveau de différentes structures en tige-boucle (figures 15 et 16). L'ARN *SRA* co-active ainsi le récepteur aux oestrogènes (Cavarretta et al., 2002; Coleman et al., 2004; Deblois and Giguere, 2003; Hatchell et al., 2006; Lanz et al., 1999; Shi et al., 2001; Watanabe et al., 2001), le récepteur aux androgènes (Kurisu et al., 2006), le récepteur à la progestérone (Lanz et al., 1999; Lanz et al., 2002), le récepteur à l'acide rétinoïque (Zhao et al., 2004), le récepteur aux hormones thyroïdes (Xu and Koenig, 2004), les protéines *DAX1* (pour dosage sensitive sex reversal protein) et *SF1* (pour steroidogenic factor-1 protein) (Xu et al., 2009), ainsi que des facteurs de différenciation myogénique (Caretto et al., 2007; Caretto et al., 2006). De plus, l'ARNnc *SRA* avec la protéine à *DEAD*-box p68 médie la fonction insulatrice de *CTCF* (pour *CCCTC*-binding factor) (Yao et al., 2010).

Le mécanisme permettant à l'ARN *SRA* de co-activer différents récepteurs nucléaires, d'activer divers facteurs de transcriptions ou encore d'activer la fonction insulatrice de certaines protéines reste mal défini. Néanmoins, il a été proposé que cet ARNnc pourrait fonctionner comme un échafaudage moléculaire permettant l'assemblage de multiples facteurs régulant l'expression génique.

Par ailleurs, étant donné son rôle important dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes, l'activité de l'ARNnc *SRA* est contrôlée par divers mécanismes. Ainsi, l'ARN *SRA* interagit avec deux co-répresseurs des récepteurs nucléaires, appelés *SLIRP* (pour *SRA* Stem-Loop Interacting RNA binding Protein) (Hatchell et al., 2006) et *SHARP* (pour *SMRT1/HDAC1*-associated repressor protein) (Shi et al., 2001). *SLIRP* et *SHARP* ciblent la même région de l'ARN *SRA*, et en se liant à cette région, ils répriment la co-activation des récepteurs nucléaires par *SRA*.

L'ARN *SRA* est également la cible de modification post-transcriptionnelle, la pseudo-uridylation, qui consiste en l'isomérisation de résidus uridine spécifiques (figure 15). L'ARN *SRA* est le substrat de deux pseudouridine synthases, qui se lient à des récepteurs nucléaires et agissent comme des co-activateurs (Zhao et al., 2004; Zhao et al., 2007). La pseudo-

Choc thermique

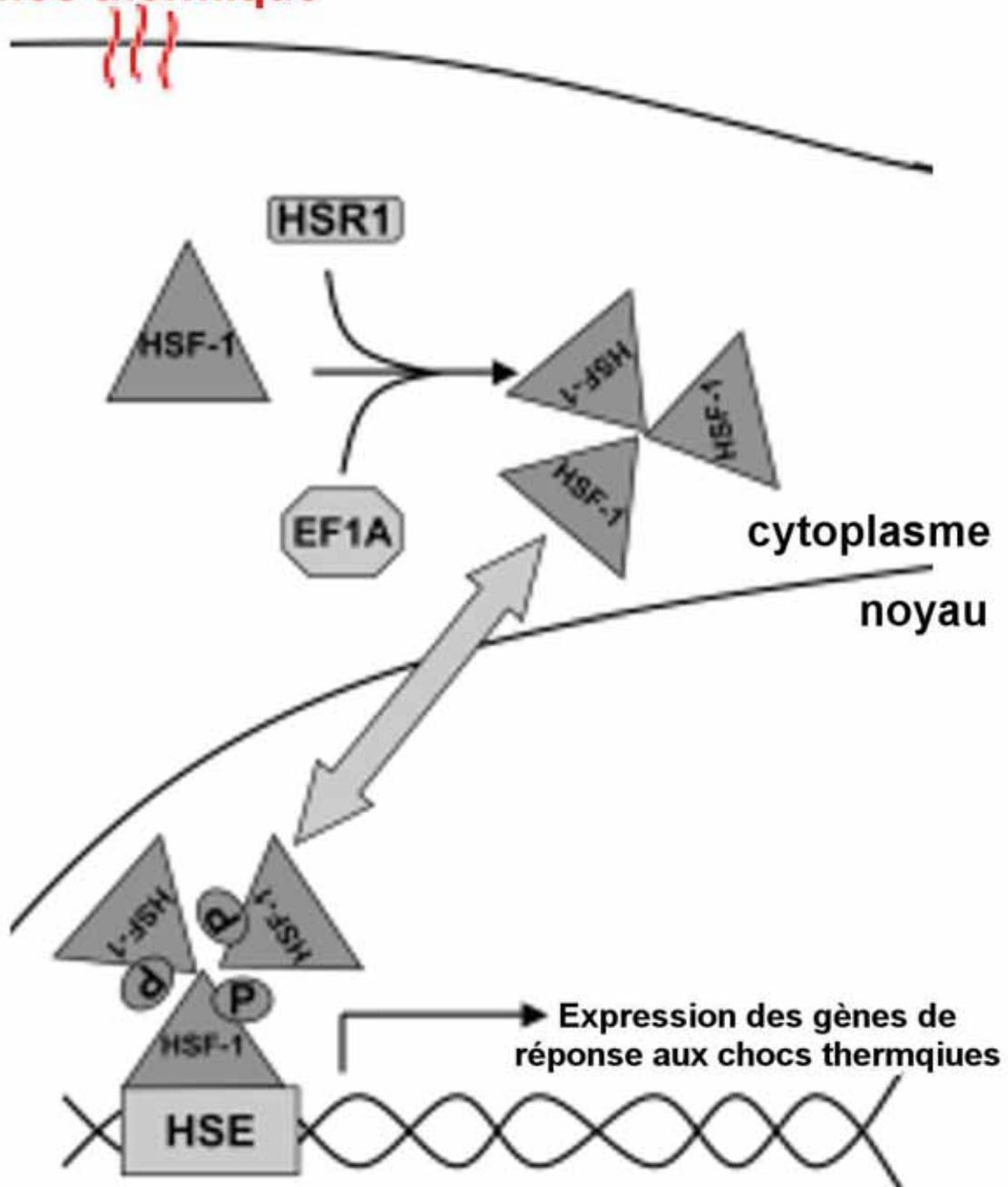


Figure 17 : Mode d'action de l'ARNnc HSR1

Le facteur de transcription HSF1 (pour Heat Shock Factor 1) est normalement localisé dans le cytoplasme des cellules sous forme monomérique. En réponse à un choc thermique, l'ARNnc HSR1 collabore avec le facteur d'élongation de la traduction eEF1A pour permettre l'activation du facteur de transcription HSF1. L'ARNnc HSR1 et le facteur eEF1A permettent la trimérisation et la translocation dans le noyau du facteur HSF1 qui peut alors se lier au niveau de séquences spécifiques situées dans le promoteur des gènes de réponse aux chocs thermiques : les HSE (Heat Shock Elements), et ainsi induire l'expression de ces gènes.

uridylation de SRA par ces deux enzymes semble jouer un rôle important dans la fonction de SRA en influençant sa capacité à interagir avec des protéines co-régulatrices.

III-2) L'ARN HSR1

La réponse aux chocs thermiques est le mécanisme de défense cellulaire majeur contre une exposition aux stress environnementaux. La signature de la réponse aux chocs thermiques, qui est conservée chez tous les eucaryotes, est l'induction rapide et massive de l'expression d'un groupe de protéines heat-shock et d'autres protéines cytoprotectives. L'expression des protéines heat-shock est régulée principalement au niveau transcriptionnel par le facteur de transcription HSF1 (pour Heat-Shock transcription Factor) (Sarge et al., 1991). HSF1 est présent dans les cellules non stressées sous la forme de monomères inactifs et est activé en réponse à une élévation de la température ou à d'autres types de stress. L'activation de HSF1 requiert sa localisation dans le noyau sous forme trimérique, où il se lie au promoteur de gènes induits en réponse à un choc thermique et active leur transcription (Sarge et al., 1993; Westwood and Wu, 1993). L'activation de HSF1 en réponse à un choc thermique est un processus actif dirigé par un complexe ribonucléoprotéique contenant le facteur d'élongation de la traduction eEF1A et un long ARNnc d'environ 600 nucléotides appelé HSR1 (pour heat shock RNA-1) (Shamovsky et al., 2006). HSR1 collabore avec eEF1A pour permettre la trimérisation et la liaison à l'ADN de HSF1 (figure 17); aucun de ces deux facteurs n'est suffisant pour activer seul HSF1. Ainsi, la diminution de la quantité de HSR1 dans les cellules par ARN interférence affecte la réponse au choc thermique *in vivo*, rendant les cellules thermosensibles (Shamovsky et al., 2006).

IV- Les ARNnc facilitant les modifications de la chromatine

Dans les cellules eucaryotes, de multiples ARNnc contrôlant la transcription en entraînant des changements dans la structure de la chromatine ont été identifiés. Certains de ces ARNnc établissent de larges domaines d'hétérochromatine, mettant ainsi sous silence la transcription de nombreux gènes ou même de chromosomes entiers, tandis que d'autres altèrent la chromatine dans de petites régions et contrôlent ainsi l'expression d'un seul gène ou d'un petit groupe de gènes. Ces ARNnc sont impliqués dans divers mécanismes, parmi lesquels on retrouve, la compensation de dose, l'empreinte génomique et la mise en place d'un patron d'expression au cours du développement.

IV-1) L'ARN HOTAIR

Les loci Hox, contiennent des gènes codant des facteurs de transcription, conservés au cours de l'évolution, qui orchestrent le développement chez les animaux. Chez les mammifères, il existe 39 gènes Hox organisés en quatre clusters génomiques. Les clusters HoxA, B, C et D sont localisés sur des chromosomes différents. La mise sous silence des gènes Hox est essentielle aux stades précoces du développement car une expression prématurée de ces gènes peut entraîner des défauts de développement. L'activation de la transcription des gènes Hox, régulée de manière spatio-temporelle au cours du développement embryonnaire, permet ensuite la mise en place de l'axe antéro-postérieur. Des ARNnc sont également synthétisés à partir des loci Hox (Rinn et al., 2007; Sessa et al., 2007). Parmi ces ARNnc, un ARN de 2,2 Kb appelé HOTAIR, exprimé à partir du locus humain HoxC dans des régions postérieures et distales, met sous silence l'expression des gènes du cluster HoxD en *trans* (Rinn et al., 2007). Pour cela, HOTAIR s'associe à deux complexes de modification des histones : PRC2, un complexe responsable de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) (Rinn et al., 2007), et le complexe LSD1/CoREST/REST responsable de la déméthylation de

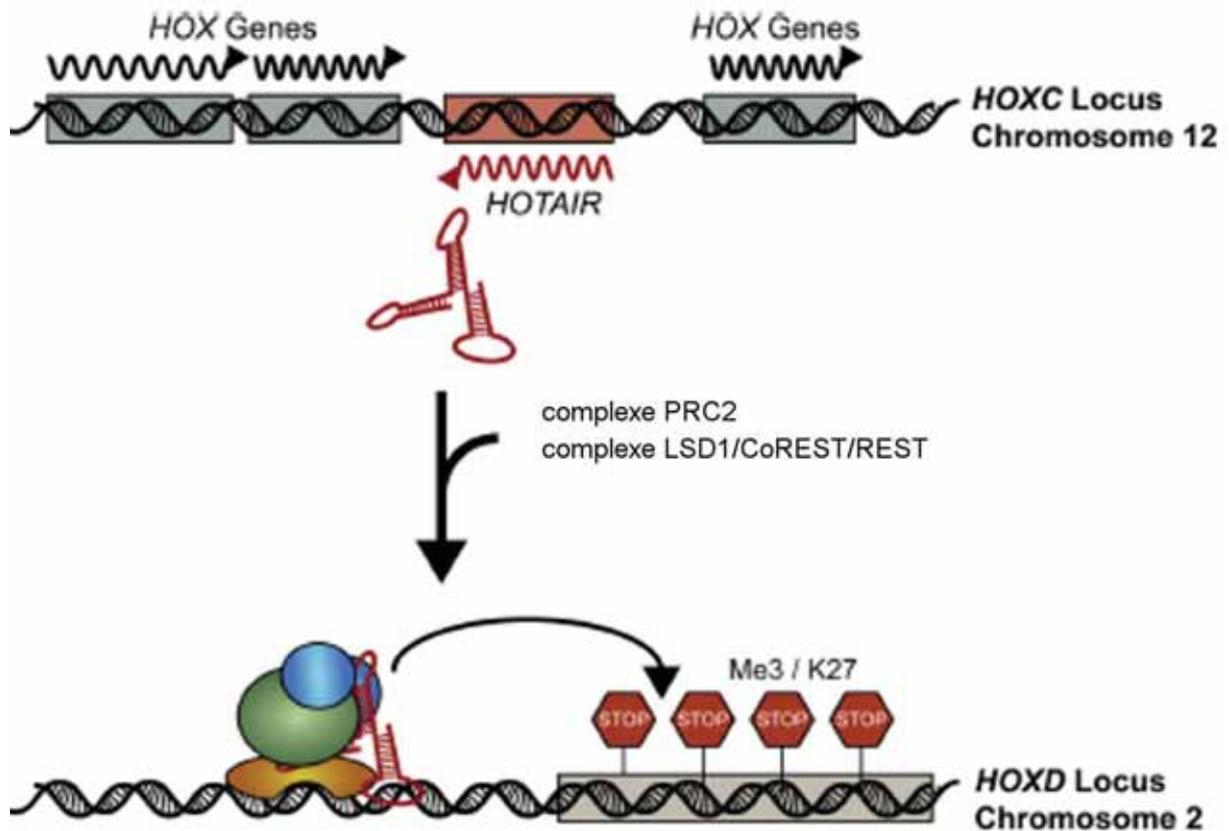


Figure 18 : Mécanisme de mise sous silence du locus de 40 kb HoxD par l'ARNnc HOTAIR (tiré de Gibb et al, 2011)

Le long ARNnc HOTAIR est synthétisé à partir du locus HoxC et recrute les complexes PRC2 et LSD1 au niveau du locus HoxD. PRC2 méthyle H3K27 tandis que LSD1 déméthyle H3K4me2. Cela permet donc une combinaison spécifique de modifications d'histones, entraînant la formation d'hétérochromatine et la mise sous silence des gènes ciblés.

H3K4me2 (Tsai et al., 2010). HOTAIR recrute ces deux complexes distincts au niveau de ses gènes cibles et PRC2 méthyle H3K27 tandis que LSD1 déméthyle H3K4me2 (figure 18). Cela permet donc une combinaison spécifique des modifications d'histones, entraînant la formation d'hétérochromatine et la mise sous silence des gènes ciblés. Ainsi, il a été montré qu'en l'absence des deux domaines de liaison de HOTAIR, les fonctionnalités épigénétiques de cet ARNnc sont complètement abolies (Tsai et al., 2010). De plus, une diminution de la quantité d'ARN HOTAIR dans des fibroblastes humains induit une augmentation de l'expression de différents membres de la famille Hox, associée à une perte de triméthylation de H3K27 et une augmentation de H3K4me2 (Rinn et al., 2007; Tsai et al., 2010). HOTAIR semble jouer un rôle dans l'initiation de la mise sous silence transcriptionnel plutôt que dans sa maintenance (Kaneko et al., 2010; Rinn et al., 2007; Tsai et al., 2010).

IV-2) Les ARN Xist et Tsix

Dans les cellules femelles de mammifères, l'un des deux chromosomes X est inactivé, pour ne garder qu'une seule copie active, comme dans les cellules mâles. Ce mécanisme qui permet d'égaliser la dose des produits de gènes du chromosome X entre mâles et femelles est appelé compensation de dose. Cette mise sous silence transcriptionnel de l'un des deux chromosome X dans les cellules somatiques femelles, appelée inactivation du chromosome X, a lieu au cours du développement précoce chez tous les marsupiaux et les mammifères placentaires. Chez les mammifères, le choix du chromosome X à inactiver est aléatoire. Une fois que le chromosome X inactif (Xi) a été complètement mis sous silence, l'état silencieux est hérité stablement pendant toutes les divisions cellulaires successives.

L'inactivation du chromosome X est causée par un ARNnc de 17 Kb appelé Xist (pour X-inactive specific transcript), qui est absolument essentiel pour la mise en place de cette inactivation (Marahrens et al., 1997; Penny et al., 1996). Cet ARN est transcrit à partir du gène *Xist*, qui est localisé dans une région du chromosome X appelée centre d'inactivation du X (Xic), contenant des gènes et des séquences régulatrices impliqués dans le processus d'inactivation du X. Au cours de la mise en place de l'inactivation du chromosome X, l'ARN Xist commence à être synthétisé uniquement à partir du futur chromosome Xi (Borsani et al., 1991; Brockdorff et al., 1991; Brockdorff et al., 1992; Brown et al., 1991). Dans les embryons femelles, la transcription à partir du gène *Xist* est sur-réglée sur le futur chromosome Xi et, les ARN Xist recouvrent le chromosome en s'associant à la chromatine à proximité de leur site de transcription (Brown et al., 1992). Xist initie l'inactivation du chromosome X en facilitant le recrutement de facteurs de mise sous silence transcriptionnel, tels que des protéines du groupe Polycomb qui remodelent la chromatine (Chadwick and Willard, 2004; Mak et al., 2002; Plath et al., 2003; Silva et al., 2003; Zhao et al., 2008). Ainsi, à la suite de l'expression de Xist, les histones sur le chromosome X perdent les modifications marquant la chromatine transcriptionnellement active (telles que l'acétylation de H3K9) qui sont remplacées par des modifications marquant la chromatine transcriptionnellement inactive (telles que l'hyperméthylation de H3K9 ou la triméthylation de H3K27). Enfin, de nombreuses modifications de la chromatine telles que la méthylation et l'ubiquitylation des histones, et la déposition de variants d'histones, se propagent sur le chromosome X à partir duquel *Xist* est exprimé entraînant ainsi la dissémination de l'hétérochromatine sur la totalité du chromosome Xi.

L'expression mono-allélique du gène *Xist* est considérée comme la clé permettant de réguler l'inactivation d'un seul chromosome X. Plusieurs études ont démontré que l'expression asymétrique du gène *Xist* dépendait de réseaux moléculaires complexes impliquant des facteurs de pluripotence tels que Nanog, Oct3/4 et Sox2 (Navarro et al., 2008), au moins trois ARNnc Tsix, Ftx et Jpx (Chureau et al., 2011; Navarro et al., 2005; Tian et al., 2010),

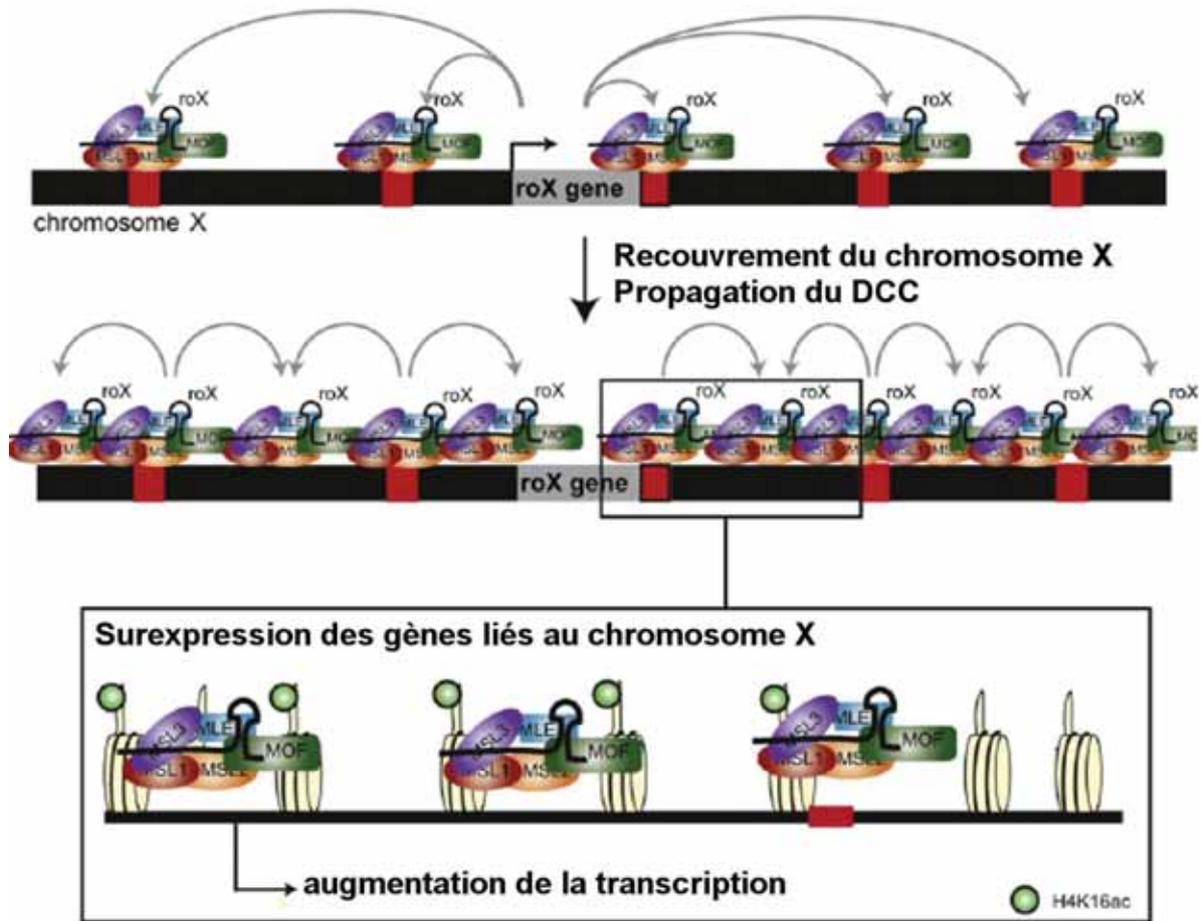


Figure 19 : La compensation de dose chez *D. melanogaster* (tiré de Maenner et al, 2012)

La compensation de dose chez la drosophile implique une augmentation de la transcription de nombreux gènes liés à l'unique chromosome X mâle. Le complexe de compensation de dose (DCC) constitué des protéines MSL1, MSL2, MSL3, MOF et MLE et de l'un des deux ARNnc roX, roX1 ou roX2 s'assemble et se propage sur le chromosome X. La protéine MOF de ce complexe est une histone acétyltransférase spécifique de la lysine 16 de l'histone H4. L'enrichissement en H4K16ac provoquée par MOF entraîne une stimulation de la transcription des gènes liés au chromosome X.

d'autres loci comme Xpr (Augui et al., 2007) et un gène lié à l'X Rnf12 (Barakat et al., 2011; Jonkers et al., 2009; Navarro et al., 2011). Par ailleurs, il a été montré que l'appariement transitoire des chromosomes X au niveau du locus Xic, pouvait également favoriser l'expression asymétrique du gène *Xist* (Masui et al., 2011).

Parmi tous ces facteurs impliqués dans l'expression mono-allélique de *Xist*, l'ARNnc Tsix est le mieux caractérisé. Tsix est le transcrit antisens de *Xist*, et leur expression sur un chromosome X donné est mutuellement exclusive (Lee et al., 1999). Tsix est transcrit à partir du chromosome X actif (Xa) avant et pendant la mise en place de l'inactivation du chromosome X (Lee et al., 1999), et protège le chromosome Xa de l'inactivation par l'ARN *Xist*. Lorsque la différenciation des cellules commence, l'expression de l'ARN Tsix persiste sur le futur chromosome Xa, et son expression cesse sur le futur chromosome Xi. Cette perte de l'expression de Tsix permet une augmentation de l'expression de l'ARN *Xist* et sa propagation sur le futur chromosome Xi. Le mécanisme précis par lequel Tsix régule négativement *Xist* n'est pas clairement établi, mais plusieurs hypothèses ont été émises. Ainsi, l'inhibition pourrait être liée à une interférence transcriptionnelle (Luikenhuis et al., 2001; Sado et al., 2006; Shibata and Lee, 2004). Dans un autre modèle, il a été proposé que les petits ARN, produits par l'enzyme Dicer de la machinerie d'ARN interférence à partir des duplex ARN *Xist*/Tsix se formant au niveau du chromosome Xa, pourraient mettre sous silence le gène *Xist* par un mécanisme analogue à l'extinction transcriptionnelle de gènes (TGS) (Ogawa et al., 2008). Le recrutement de complexes de remodelage de la chromatine par l'ARN Tsix au niveau du promoteur de *Xist* a également été suggéré comme étant un mécanisme plausible pour la répression de *Xist* par Tsix (Sun et al., 2006).

IV-3) Les ARN roX

La compensation de dose chez la drosophile est différente de celle des mammifères, en cela qu'elle implique une augmentation de la transcription de nombreux gènes liés à l'unique chromosome X mâle. Cette augmentation est liée à la liaison sélective du Complexe de Compensation de Dose (DCC) sur des centaines de sites sur le chromosome X mâle (Deng and Meller, 2006). Le DCC, également connu sous le nom de MSL (pour Male Specific Lethal), est assemblé très tôt au cours du développement embryonnaire à partir d'au moins cinq protéines et de l'un des deux ARNnc roX, roX1 ou roX2 (pour RNA On X) (figure 19). Tandis que les cinq protéines sont toutes requises pour la compensation de dose, les deux ARNnc roX, sont fonctionnellement redondants ; la compensation de dose et la liaison du DCC au chromosome X requièrent soit roX1 soit roX2. Au sein du DCC, les protéines MSL1, MSL2 et MSL3 sont considérées comme des échafaudages permettant une association correcte de ce complexe avec le chromosome X. Les deux autres protéines du DCC possèdent des activités enzymatiques. Ainsi, MOF (pour Males absent On the First), est une histone acétyltransférase spécifique de la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16ac). MOF est requise pour l'enrichissement de H4K16ac sur le chromosome X mâle (Bone et al., 1994; Gelbart et al., 2009; Gu et al., 1998; Turner et al., 1992), ce qui entraîne une décondensation de la chromatine (Bone et al., 1994; Turner et al., 1992) et une stimulation de la transcription (Akhtar and Becker, 2000; Dou et al., 2005; Kapoor-Vazirani et al., 2008). Enfin, la protéine MLE (pour maleless) est une hélicase ARN/ADN dont le rôle n'est pas clairement défini mais qui pourrait être impliquée dans la régulation de l'association de l'ARN roX avec les autres composants du DCC.

Les deux ARNnc roX sont exprimés à partir du chromosome X (Meller, 2003). Pourtant, les ARN roX peuvent se localiser au chromosome X même lorsqu'ils sont expérimentalement exprimés à partir d'un transgène sur un autosome. Dans ces conditions, la transcription à partir du chromosome X est sur-réglée et la compensation de dose fonctionne normalement

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE-

Chapitre II : Les ARN non codants impliqués dans la régulation de la transcription

(Meller and Rattner, 2002; Meller et al., 1997). Cela montre que ces ARN peuvent activer la transcription en *trans*. Les ARNnc roX pourraient jouer un rôle dans la coordination de l'assemblage du DCC fonctionnel. En effet, la localisation des sous-unités MLE, MOF, et MSL3 du DCC au chromosome X est sensible au traitement des noyaux à la RNase (Akhtar et al., 2000; Buscaino et al., 2003; Richter et al., 1996).

Chapitre III : Rôle des RNP 7SK dans la régulation de la transcription

Tandis que le snARN 7SK a été décrit pour la première fois en 1976 (Zieve and Penman, 1976), sa fonction n'a été découverte que 25 ans plus tard, lorsqu'il a été identifié comme constituant l'élément central de la petite particule ribonucléoprotéique nucléaire (snRNP) 7SK, qui séquestre et inhibe le facteur positif d'élongation de la transcription, P-TEFb (Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001). Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, l'activité du complexe P-TEFb est essentielle pour la transcription de la majorité des gènes codants pour des protéines. Or, il a été estimé que plus de la moitié des complexes P-TEFb cellulaires sont séquestrés au sein des snRNP 7SK. Ainsi, la disponibilité de P-TEFb actif est contrôlée dans les cellules par sa séquestration au sein du complexe inactif contenant le snARN 7SK, deux protéines HEXIM et les protéines LARP7 et MePCE. La libération rapide de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK en réponse à divers signaux peut être considérée comme un moyen de répondre rapidement à des besoins accrus en transcription. Le maintien de l'équilibre entre formes active et inactive de P-TEFb est donc essentiel pour réguler la croissance et la prolifération cellulaire. En effet, comme nous le verrons dans le chapitre IV, une dérégulation de cet équilibre peut entraîner le développement de pathologies sévères. Lorsque P-TEFb et HEXIM se dissocient de la snRNP 7SK, un autre groupe de facteurs s'associe avec le snARN 7SK. Ces facteurs sont les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (ou hnRNP) A1, A2, Q1 et R.

I) La RNP 7SK/HEXIM/P-TEFb

I-1) Le complexe P-TEFb

1- Les sous-unités du complexe P-TEFb

P-TEFb est un hétérodimère constitué de la kinase dépendante des cyclines 9 (CDK9) et d'une des cyclines de type C, la Cycline T1 (CycT1), la Cycline T2a (CycT2a) ou la Cycline T2b (CycT2b).

Par ailleurs, la cycline K (CycK) humaine, a longtemps été considérée comme l'une des cyclines associées à CDK9, tout comme les CycT1 et CycT2 (Fu et al., 1999; Peterlin and Price, 2006). Néanmoins, il a récemment été montré que la CycK ne s'associe pas avec CDK9, mais s'associe à CDK12 et CDK13, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, pour former deux complexes distincts : CDK12/CycK et CDK13/CycK (Blazek et al., 2011).

Comme c'est le cas pour toutes les paires CDK-Cycline, CDK9 n'exerce son activité kinase que lorsqu'elle est associée à son partenaire cycline.

a) CDK9

La forme principale de CDK9 est une protéine de 372 acides aminés ayant une masse moléculaire d'environ 42 kDa. Une autre isoforme de CDK9 de 55 kDa contient une extension de 117 acides aminés dans la région amino-terminale (Shore et al., 2005; Shore et al., 2003). Contrairement aux CDK qui contrôlent le cycle cellulaire l'activité de CDK9 est constante au cours de la progression du cycle cellulaire (Garriga et al., 1998). L'expression de CDK9 est ubiquitaire avec une plus forte expression dans les tissus en différenciation terminale (Grana et al., 1994). Les deux isoformes de CDK9 sont exprimées à partir de deux promoteurs différents sur le gène *CDK9*. L'expression de ces deux isoformes varie entre différents tissus chez la souris (Shore et al., 2005). Il est possible que la présence d'une

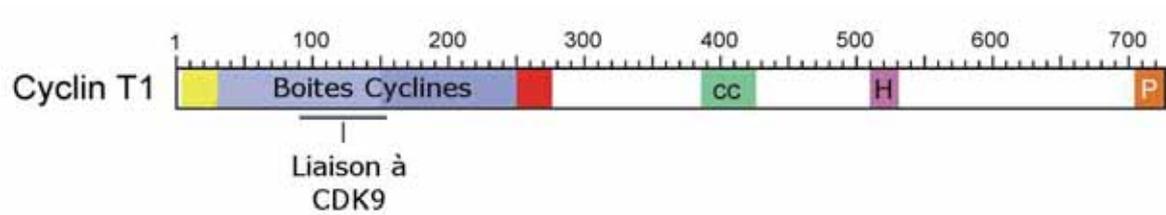


Figure 20 : Représentation schématique de la Cycline T1

Les boîtes cyclines permettent l'interaction avec CDK9. Le motif riche en histidines (en violet) favorise l'interaction avec le domaine carboxy-terminal de l'ARN pol II. La CycT1 peut interagir avec Tat et TAR grâce à une région située dans l'une des boîtes cyclines (colorée en rouge) appelée TRM. La CycT1 contient également un motif « coiled coil » (en vert) et un motif riche en prolines et sérines (en orange) à son extrémité carboxy-terminale.

extrémité amino-terminale plus longue dans CDK9₅₅ puisse jouer un rôle dans sa fonction. Chaque isoforme de CDK9 pourrait donc contrôler la transcription de divers groupes de gènes. Par exemple, les deux formes de CDK9 s'associent à MyoD, un facteur impliqué dans la différenciation musculaire, mais CDK9₅₅ semble être plus important pour la différenciation des cellules satellites après une lésion musculaire (Giacinti et al., 2008).

CDK9 contient une structure en boucle T qui est conservée entre les protéines CDK. Dans toutes les protéines CDK, la phosphorylation de cette boucle T, induit un changement conformationnel de cette boucle qui permet l'accès de l'ATP et du substrat au cœur catalytique de l'enzyme (Morgan, 1995; Pavletich, 1999; Russo et al., 1996). La phosphorylation de cette boucle T est considérée comme essentielle pour une activation maximale des CDK. Le résidu Thr186 de CDK9 correspond au résidu pouvant être phosphorylé dans les autres CDK. L'activité kinase de CDK9 dépend de la phosphorylation de ce résidu (Baumli et al., 2008; Li et al., 2005).

b) Les cyclines T

Les cyclines partenaires de CDK9 sont la CycT1 et deux variants d'épissage la CycT2a et la CycT2b qui constituent la famille des cyclines de type C. Ces trois cyclines s'associent avec les deux isoformes de CDK9, CDK9₄₂ et CDK9₅₅. Elles possèdent deux boîtes cyclines à leur extrémité amino-terminale, une région riche en histidines, leur conférant leur capacité de liaison au CTD de l'ARN pol II, et une extrémité carboxy-terminale riche en prolines et sérines (figure 20). Dans les cellules HeLa, environ 80% des CDK9 sont associées à la CycT1, et 20% aux Cyc T2a et T2b (Peng et al., 1998b). La CycT1 est exprimée de façon ubiquitaire mais, contrairement à CDK9, elle ne s'exprime pas constamment à un taux élevé, la protéine étant synthétisée suite à des stimuli spécifiques. Certains tissus spécialisés, tels que le sang et les organes lymphoïdes, présentent une forte expression de la CycT1 (De Luca et al., 2001). La CycT2, quant à elle, est exprimée dans tous les tissus et les organes de souris adultes et, même si la CycT1 semble être le partenaire majeur de CDK9, la CycT2 est essentielle pour l'embryogenèse chez la souris (Kohoutek et al., 2009). De plus, tandis que la majorité des gènes semblent être régulés par la CycT1 ou la CycT2 indifféremment, il existe des groupes de gènes régulés spécifiquement par l'une ou l'autre de ces cyclines (Kohoutek et al., 2009). Par ailleurs, contrairement aux autres cyclines dont le niveau d'expression varie dans les cellules au cours du cycle cellulaire, l'expression des cyclines de type C n'oscille pas (Garriga et al., 1998).

P-TEFb est souvent considéré comme le complexe CDK9₄₂/CycT1, mais il faut également prendre en considération le fait qu'il existe deux formes de CDK9 (CK9₄₂ et CDK9₅₅) et au moins trois isoformes de cyclines de type C (CycT1, CycT2a et CycT2b). Ce qui donne six complexes P-TEFb différents.

2- Régulation de l'activité de P-TEFb

Etant donné l'importance de P-TEFb pour l'activité transcriptionnelle de la cellule, ce complexe est sujet à une régulation fonctionnelle considérable de sorte à répondre aux changements en besoins transcriptionnels des cellules. Plusieurs mécanismes permettent de réguler l'activité de P-TEFb au sein des cellules.

a) Recrutement spécifique de P-TEFb au niveau des promoteurs

Ni CDK9 ni la CycT1 ne possèdent de domaine de liaison à l'ADN connu. Or, P-TEFb doit être recruté aux promoteurs des divers gènes sur lesquels l'ARN pol II est en pause transcriptionnelle à proximité du promoteur afin de stimuler l'élongation de la transcription.

P-TEFb étant requis pour la transcription d'une grande partie des gènes cellulaires, il est concevable qu'il existe un mécanisme commun pour le recrutement de P-TEFb aux promoteurs de ces gènes. Il a été montré que, tandis que plus de la moitié des complexes P-TEFb cellulaires sont séquestrés au sein de la snRNP 7SK, l'autre moitié, qui constitue la forme catalytiquement active de P-TEFb, s'associe avec la protéine Brd4 (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Brd4, initialement identifié comme un composant du complexe Médiateur (Wu et al., 2003b; Yang et al., 2005), recrute P-TEFb au niveau des promoteurs, ce qui stimule la phosphorylation de la Ser2 du CTD de l'ARN pol II et l'élongation de la transcription à partir de divers promoteurs *in vivo* et *in vitro* (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Brd4 est une protéine nucléaire ubiquitairement exprimée appartenant à la famille des protéines BET, qui chez la levure et chez les animaux contiennent un double bromodomaine et un domaine extra-terminal (Dey et al., 2000; Jeanmougin et al., 1997). Tandis qu'un motif conservé localisé à l'extrémité carboxy-terminale de Brd4 est responsable de la liaison à P-TEFb (Bisgrove et al., 2007), les deux bromodomains situés à son extrémité amino-terminale ont été impliqués dans l'interaction avec P-TEFb (Jang et al., 2005), ainsi qu'avec les queues acétylés des histones et les résidus acétylés de nombreuses autres protéines (Dey et al., 2003; Zeng and Zhou, 2002). Le recrutement de P-TEFb par Brd4 au niveau des promoteurs serait donc dirigé par l'interaction directe de Brd4 avec les histones acétylées et le complexe Médiateur. L'importance du recrutement de P-TEFb par Brd4 a été révélée par une analyse par ChIP de nombreux gènes de réponse précoce à l'inflammation dans des macrophages. En effet, en réponse à un stimulus, Brd4 recrute P-TEFb au promoteur de ces gènes de réponse précoce, l'ARN pol II en pause à proximité du promoteur de ces gènes entre alors rapidement en élongation productive après la phosphorylation de la Ser2 de son CTD par P-TEFb (Hargreaves et al., 2009). En revanche, il semble qu'une fois recruté au niveau des promoteurs par Brd4, P-TEFb ne requiert pas d'autre facteur pour interagir avec l'ARN pol II. En effet, il a été montré que l'extrémité carboxy-terminale de la CycT1 interagit directement avec le CTD de l'ARN pol II (Taube et al., 2002). De plus, chez *C. elegans*, le répresseur transcriptionnel PIE-1 peut inhiber l'élongation transcriptionnelle en bloquant la liaison de la CycT1 au CTD de l'ARN pol II (Zhang et al., 2003). Brd4 ne semble donc pas requis pour l'interaction entre P-TEFb et le CTD de l'ARN pol II après l'étape initiale de recrutement. Aussi, contrairement à P-TEFb, Brd4 ne semble pas voyager avec l'ARN pol II le long du gène. En effet, des analyses par ChIP montrent que l'association de Brd4 est significativement plus élevée au promoteur des gènes alors que P-TEFb s'associe à travers toute la région codante (Byun et al., 2009). Par ailleurs une étude a montré que *in vitro*, Brd4 est relargué des complexes d'élongation entre les positions +14 et +36 (Zhou et al., 2009).

Le recrutement de P-TEFb par Brd4 est probablement important pour l'élongation de la transcription de nombreux gènes. Néanmoins, plusieurs facteurs de transcription séquence-spécifiques tels que CIITA (Kanazawa et al., 2000), NF- κ B (Barboric et al., 2001), c-Myc (Gargano et al., 2007; Kanazawa et al., 2003), STAT3 (Giraud et al., 2004; Hou et al., 2007), le récepteur aux androgènes (Lee et al., 2001), le récepteur des hydrocarbures aromatiques (Tian et al., 2003), MyoD (Giacinti et al., 2006; Simone et al., 2002), MEF2 (Nojima et al., 2008), PPAR γ (Iankova et al., 2006), AIRE (Oven et al., 2007; Zumer et al., 2011), l'actine G (Qi et al., 2011), ou encore la protéine Tat du VIH-1 ont également été identifiés comme des facteurs interagissant avec P-TEFb qui pourraient potentiellement recruter P-TEFb au niveau de leur promoteurs cibles respectifs. Ces facteurs étant des facteurs de transcription gène-spécifiques, le recrutement de P-TEFb par ces derniers devrait affecter seulement un groupe limité de gènes.

Il faut donc noter que malgré le fait que Brd4 recrute P-TEFb pour la transcription générale, ce n'est pas nécessairement le seul ou le plus efficace des moyens de recruter P-TEFb au

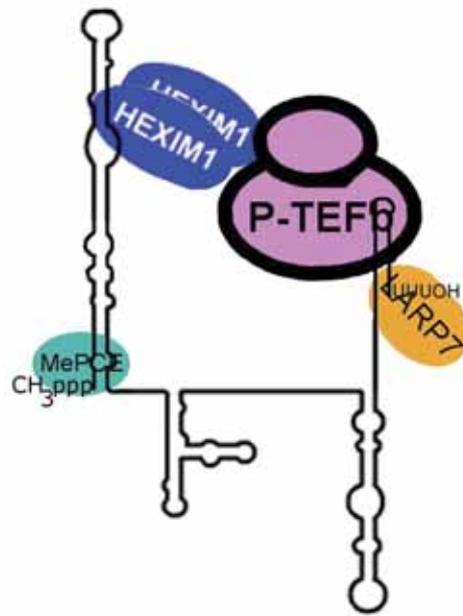


Figure 21 : Séquestration de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK

L'incorporation de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK requiert la liaison d'un dimère d'HEXIM sur la structure en tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK. Cette interaction ARN-protéine induit un changement conformationnel au sein des protéines HEXIM, qui révèle leur domaine de liaison à la cycline T. La séquestration de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK nécessite également la présence de la structure en tige-boucle située à l'extrémité 3' du snARN 7SK. Au sein de ce complexe, LARP7 et MePCE coopèrent pour stabiliser le snARN 7SK qu'elles protègent à ses extrémités 3' et 5' respectivement contre la dégradation par des exonucléases. Il faut noter que chaque snRNP 7SK séquestre un (Schonichen, 2010) ou deux (Dulac, 2005 ; Li 2005) complexes P-TEFb. Dans ce schéma un seul complexe P-TEFb a été représenté pour simplifier la vision globale du complexe.

niveau d'une matrice en particulier. Ainsi, l'interaction de P-TEFb avec divers activateurs transcriptionnels gène-spécifiques pourrait potentiellement contribuer à son recrutement en supplémentant ou en facilitant la fonction de Brd4. En réalité, il est possible que pour n'importe quel gène dont la transcription est préférentiellement régulée à l'étape d'élongation, plusieurs mécanismes soient employés pour maximiser les chances de recruter P-TEFb au niveau du promoteur de ce gène.

b) Régulation dynamique de P-TEFb par son association avec des co-facteurs

L'adaptation de la disponibilité de P-TEFb aux besoins transcriptionnels de la cellule constitue l'un des mécanismes majeurs de régulation de son activité. Le facteur P-TEFb existe sous deux formes dans les cellules, une forme inactive séquestrée au sein de la snRNP 7SK, et une forme active le plus souvent associée à la protéine Brd4, ou à d'autres facteurs de transcription, pour être recrutée au promoteur des gènes (He et al., 2008; Jeronimo et al., 2007; Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001; Yik et al., 2003). L'association de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK est un mécanisme réversible et dynamique qui est modulé en réponse à diverses conditions affectant globalement la croissance et la différenciation cellulaire. La snRNP 7SK peut donc être considérée comme un réservoir cellulaire de P-TEFb mobilisable à tout moment par la cellule. Cet équilibre dynamique entre les formes active et inactive de P-TEFb permet d'adapter finement sa disponibilité en fonction des besoins transcriptionnels de la cellule.

Séquestration au sein de la snRNP 7SK

Dans des cellules HeLa en phase exponentielle de croissance, plus de la moitié des complexes P-TEFb nucléaires sont séquestrés au sein de la snRNP 7SK qui contient le snARN 7SK et les protéines HEXIM, LARP7 et MePCE (figure 21). Chaque snRNP 7SK séquestre un (Schonichen et al., 2010) ou deux (Dulac et al., 2005; Li et al., 2005) complexes P-TEFb. L'incorporation de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK requiert la liaison d'un dimère d'HEXIM sur la structure en tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK (Belanger et al., 2009; Blazek et al., 2005; Egloff et al., 2006). Cette interaction ARN-protéine induit un changement conformationnel au sein des protéines HEXIM, qui révèle leur domaine de liaison à la cycline T (Barboric et al., 2005; Michels et al., 2004). Les résidus Phe208 et Tyr271 d'HEXIM obstruent alors la poche à ATP de CDK9 inactivant ainsi son activité kinase (Li et al., 2005). La séquestration de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK nécessite également la présence de la structure en tige-boucle située à l'extrémité 3' du snARN 7SK (Egloff et al., 2006). Le snARN 7SK fonctionne donc comme un échafaudage moléculaire pour maintenir l'intégrité de la snRNP 7SK, qui séquestre P-TEFb et inhibe l'activité kinase de CDK9 (Yik et al., 2003). Enfin, la phosphorylation de la Thr186 de CDK9, dont dépend son activité kinase, joue également un rôle critique dans l'inactivation de P-TEFb. Ainsi, CDK9 phosphorylé sur le résidu Thr186 est trouvé majoritairement associé au sein de la snRNP 7SK (Chen et al., 2008) et, *in vitro*, l'association de P-TEFb au sein du complexe inactif dépend de cette modification (Chen et al., 2008; Chen et al., 2004; Li et al., 2005; Wang et al., 2008).

Au sein de ce complexe, LARP7 et MePCE coopèrent pour stabiliser le snARN 7SK qu'elles protègent à ses extrémités 3' et 5' respectivement contre la dégradation par des exonucléases (He et al., 2008; Jeronimo et al., 2007; Xue et al., 2010). Ensemble, LARP7, MePCE et le snARN 7SK forment la snRNP 7SK « cœur ». En effet, contrairement à HEXIM et P-TEFb qui sont libérés en réponse à divers signaux induisant le désassemblage de cette snRNP 7SK, MePCE et LARP7 restent associées au snARN 7SK.

Libération de P-TEFb de la snRNP 7SK

L'un des mécanismes permettant la libération de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK fait intervenir la protéine Brd4. Des travaux récents suggèrent qu'en plus de son rôle dans le recrutement de P-TEFb au niveau des promoteurs, Brd4 pourrait jouer un rôle actif dans le désassemblage de la snRNP 7SK afin de libérer P-TEFb (Krueger et al., 2010; Schroder et al., 2012). Il a été montré, *in vitro* et *in vivo*, que le désassemblage de la snRNP 7SK est provoqué par le domaine d'interaction avec P-TEFb situé à l'extrémité carboxy-terminale de Brd4 (Krueger et al., 2010; Schroder et al., 2012). La libération de P-TEFb serait alors accompagnée d'un changement conformationnel important au sein du snARN 7SK (Krueger et al., 2010).

Les signaux hypertrophiques, le stress, l'irradiation aux UV, et d'autres signaux externes entraînent également le désassemblage de la snRNP 7SK et la libération de P-TEFb (Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001; Yik et al., 2003). De même, des composés inhibant directement la transcription, comme l'actinomycine D, ou indirectement comme les inhibiteurs de P-TEFb, le DRB ou le flavopiridol, entraînent la libération de P-TEFb de la snRNP 7SK (Biglione et al., 2007; Nguyen et al., 2001; Yang et al., 2001). Enfin, le traitement par des agents de différenciation, comme le HMBA (pour hexamethylene bisacetamide), entraîne également la libération de P-TEFb avant d'entraîner une augmentation de la synthèse d'HEXIM (He et al., 2006).

L'absence de transcription par l'ARN pol II déclenche l'activation de cascades de signalisation qui libèrent P-TEFb de la snRNP 7SK. Des études détaillées ont notamment été menées sur l'effet du HMBA. Il a ainsi été montré que, dans des cellules érythroleucémiques murines, peu après le début du traitement par le HMBA, la snRNP 7SK/HEXIM/P-TEFb est désassemblée de manière efficace mais transitoire. Dans le même temps, une augmentation de la formation du complexe Brd4/P-TEFb a été notée. Lorsque le traitement avec le HMBA se poursuit, l'expression d'HEXIM, dépendante de P-TEFb, augmente significativement, ce qui entraîne un ré-assemblage de P-TEFb au sein de la snRNP inactive 7SK. Le désassemblage de la snRNP 7SK induit par le HMBA semble lié à l'activation transitoire de plusieurs voies de signalisation. En effet, il a été montré que le HMBA active transitoirement la voie PI3K/Akt qui entraîne la phosphorylation d'HEXIM sur les résidus Thr270 et Ser278. La phosphorylation de ces résidus abolit l'interaction entre HEXIM et P-TEFb (Contreras et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré qu'un traitement de courte durée avec le HMBA ou un traitement aux UV entraîne un influx d'ions calcium et l'activation de la voie Ca²⁺-calmoduline-PP2B. L'activation de cette voie de signalisation entraîne la déphosphorylation de la Thr186 de CDK9 par la phosphatase PP1 α . Cette déphosphorylation cause la dissociation de P-TEFb de la snRNP 7SK. Cette libération de P-TEFb, nécessite également l'intervention de la phosphatase PP2B qui agit séquentiellement et en coopération avec la phosphatase PP1 α . PP2B pourrait induire un changement conformationnel dans la snRNP 7SK qui faciliterait l'accès de PP1 α à CDK9 (Chen et al., 2008).

Néanmoins, dans le cas du traitement par un inhibiteur de P-TEFb, le flavopiridol, il a été noté que la Thr186 de la boucle T de CDK9 reste phosphorylée et aucun changement majeur dans les niveaux d'HEXIM n'a été détecté (Dow et al., 2010).

Il existe donc vraisemblablement plusieurs mécanismes alternatifs utilisés par la cellule pour entraîner la libération de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK en réponse à divers signaux.

La forme active de P-TEFb

Quel que soit le mécanisme utilisé pour libérer P-TEFb à partir de la snRNP 7SK, c'est la forme inactive de P-TEFb, déphosphorylée sur la Thr186 de CDK9, qui est recrutée au

complexe de pré-initiation par Brd4 (Chen et al., 2008). De plus, une fois associée au sein du complexe d'initiation, Brd4 inhibe transitoirement l'activité de P-TEFb en induisant l'auto-phosphorylation de la Thr29 de CDK9 (Zhou et al., 2009). Ce n'est donc qu'après la dissociation de Brd4 que P-TEFb peut être activé par phosphorylation de la Thr186 et déphosphorylation de la Thr29.

Même s'il a été montré que le recrutement de P-TEFb par Brd4 est important pour l'élongation de la transcription de nombreux gènes, la régulation de l'élongation de la transcription par P-TEFb ne dépend pas que de cette protéine. En effet, il est désormais admis que, pour de nombreux gènes, le complexe P-TEFb engagé dans l'élongation de la transcription est associé au sein d'un complexe appelé SEC (pour Super Elongation Complex). En effet, au cours de l'élongation de la transcription, la processivité de l'ARN pol II est régulée par un groupe de facteurs qui étaient auparavant considérés comme fonctionnant séparément et ayant des effets indépendants sur le complexe d'élongation de la transcription. Au moins deux facteurs d'élongation de la transcription appartiennent au SEC et activent la transcription de façon coopérative (He et al., 2010; Lin et al., 2010; Sobhian et al., 2010). Le premier facteur d'élongation trouvé dans le SEC est P-TEFb. Le deuxième facteur d'élongation du SEC est ELL, qui stimule l'élongation de la transcription en maintenant l'extrémité 3'-OH de l'ARN naissant dans l'alignement avec le site catalytique de l'ARN pol II, prévenant ainsi le « backtracking » de la polymérase. En plus de P-TEFb et ELL, le SEC contient les co-activateurs et facteurs de transcription ENL/AF9, AFF4 et probablement d'autres facteurs (He et al., 2010; Lin et al., 2010; Sobhian et al., 2010). Parmi ces facteurs, AFF4 fonctionne comme une plate-forme d'assemblage pour le SEC. En effet, diverses régions de AFF4 interagissent avec les différentes sous-unités du SEC, permettant ainsi les interactions entre P-TEFb et les autres composants du SEC, et maintenant l'intégrité du SEC (He et al., 2011; He et al., 2010; Yokoyama et al., 2010). De plus, AFF4 augmente la demi-vie de ELL, ce qui favorise l'incorporation de ELL et la formation du SEC (He et al., 2010). Par ailleurs, les protéines ENL et AF9, qui présentent une forte homologie, font partie de SEC différents. Ces protéines entrent en compétition pour la liaison à la même région de AFF4 et ne peuvent donc pas appartenir au même complexe (He et al., 2011). Les complexes AF9-SEC et ENL-SEC, ce dernier semblant être prédominant dans les cellules HeLa, présentent des fonctions similaires mais pas complètement identiques (He et al., 2011). Il est possible que l'existence de ces deux complexes SEC homologues, ayant des fonctions complémentaires, puisse permettre de mieux répondre aux besoins des divers gènes cellulaires dans diverses conditions.

Plusieurs études récentes ont montré que le SEC est ciblé par au moins deux activateurs transcriptionnels jouant des rôles importants dans des maladies humaines. En effet, la protéine Tat du VIH-1 recrute le SEC au niveau du promoteur LTR du VIH-1 pour stimuler la transcription virale (He et al., 2010; Sobhian et al., 2010). Le SEC est également ciblé par des protéines de fusion impliquant MLL, ce qui provoque le développement de certains types de leucémies aiguës chez les adultes et les enfants (Lin et al., 2010; Mueller et al., 2009; Yokoyama et al., 2010).

En plus de son implication dans des pathologies humaines, le SEC est essentiel pour l'élongation de la transcription de certains gènes cellulaires (He et al., 2010; Lin et al., 2010; Sobhian et al., 2010; Yokoyama et al., 2010). Pour mesurer l'implication du SEC dans le contrôle de l'élongation de la transcription au niveau du génome entier, des analyses par ChIP-séquençage ont été réalisées dans des cellules murines et humaines en culture en réponse à une stimulation (Lin et al., 2011). Cette étude a permis d'identifier des gènes cibles du SEC, la plupart d'entre eux étant des régulateurs du développement et des gènes de réponse précoce induits par des facteurs de croissance. Cela suggère que le recrutement du

SEC permet aux gènes de répondre rapidement et dynamiquement à des signaux développementaux et environnementaux dans différents types cellulaires chez les mammifères. Le complexe P-TEFb associé au sein du SEC est un régulateur majeur des gènes rapidement induits au cours du développement. Néanmoins, cette étude à l'échelle du génome démontre également que tous les gènes rapidement activés ne requièrent pas le SEC (Lin et al., 2011). Par ailleurs, bien que Brd4 soit recruté au niveau de ces gènes cibles du SEC, il ne semble pas jouer un rôle majeur dans leur activation. En effet, une diminution des niveaux de Brd4 dans les cellules par ARNi n'a pas d'effet majeur sur leur activation excepté pour l'un des gènes étudiés (Lin et al., 2011). Alors comment les différents SEC sont-ils recrutés pour réguler divers groupes de gènes ?

Plusieurs moyens de recrutement du SEC ont été décrits. Il a par exemple été proposé qu'en l'absence de facteurs permettant un recrutement séquence-spécifique, le domaine YEATS de ENL ou AF9 cible le SEC au niveau de la chromatine grâce à son interaction avec le facteur PAFc (pour Polymerase Associated Factor complex), et à travers PAFc, l'ARN pol II (He et al., 2011). Une autre étude a montré une interaction entre Brd4 et le SEC et propose que Brd4 pourrait être impliqué dans le recrutement du SEC au niveau de certains gènes cibles (Dawson et al., 2011). Dans différents contextes cellulaires, Brd3 et Brd4 s'associent au SEC et à PAFc, et pourraient être impliqués dans le recrutement de ces complexes au niveau de certains gènes cibles (Dawson et al., 2011). D'autres études proposent que le SEC n'est pas recruté directement sous la forme d'un super complexe pré-assemblé au niveau des promoteurs mais qu'il s'assemble plutôt séquentiellement. Ainsi, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, une étude récente a montré que ELL joue un rôle très précoce dans le cycle de transcription, avant même l'entrée en pause de l'ARN pol II. ELL, qui s'associe précocement au promoteur des gènes inductibles pour faciliter une réponse rapide aux signaux environnementaux, est requis pour le recrutement de AFF4 et P-TEFb au niveau des promoteurs de ces gènes (Byun et al., 2012). Par ailleurs, le complexe Médiateur, à travers sa sous-unité Med26, pourrait jouer un rôle dans le recrutement de P-TEFb et AFF4 (Takahashi et al., 2011). Or, ELL semble jouer un rôle dans la stabilisation du recrutement et de l'assemblage du complexe Médiateur, soulignant le rôle de ELL dans le recrutement de P-TEFb et AFF4.

c) Des modifications post-traductionnelles de P-TEFb régulent son activité

Des modifications post-traductionnelles de P-TEFb servent à réguler son activité de façon dépendante ou indépendante d'HEXIM. Ainsi, la déphosphorylation du résidu Thr186 de CDK9, ou l'acétylation des résidus Lys380, Lys386 et Lys390 de la CycT1 entraînent la libération de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK. L'acétylation du résidu Lys48 ou la phosphorylation du résidu Thr29 de CDK9 inhibent son activité. La phosphorylation du résidu Ser175 de CDK9 pourrait également jouer un rôle dans l'activité de P-TEFb.

Comme nous l'avons évoqué, la phosphorylation de la Thr186 de CDK9 joue un rôle critique dans la séquestration de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK. La déphosphorylation de ce résidu, par l'action séquentielle des phosphatases PP2B et PP1 α , entraîne la libération de P-TEFb de la snRNP 7SK. Il a été montré que la Thr186 de CDK9 peut également être déphosphorylée par PPM1A/PPM1B (Chen et al., 2008; Wang et al., 2008). De plus, *in vivo*, l'expression d'un inhibiteur de la phosphatase PP1 entraîne une augmentation de la phosphorylation de la Thr186 de CDK9 et une augmentation de l'association de CDK9 avec le snARN 7SK (Ammosova et al., 2011b). La déphosphorylation de la Thr186 est importante non seulement pour la libération de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK, mais aussi pour le recrutement de P-TEFb au complexe de pré-initiation par Brd4 (Chen et al., 2008). En effet, Brd4 recrute majoritairement la forme non phosphorylée, inactive de CDK9 au PIC (Chen et al., 2008). Après la synthèse d'un court transcrit ARN, CDK9 est alors re-phosphorylée sur la

Thr186, ce qui permet l'activation de cette kinase (Isel and Karn, 1999; Ping and Rana, 1999; Zhou et al., 2001). *In vitro*, la Thr186 est une cible de l'autophosphorylation par CDK9 (Baumli et al., 2008). Néanmoins, cette autophosphorylation n'a pas été démontrée *in vivo* et aucune kinase phosphorylant ce résidu n'a été identifiée à ce jour.

L'acétylation des résidus Lys380, Lys386, Lys390 et Lys404 de la CycT1 par l'histone acétyltransférase p300, entraîne la dissociation d'HEXIM et 7SK de P-TEFb. Ainsi, la CycT1 acétylée est retrouvée exclusivement dans les complexes P-TEFb actifs (Cho et al., 2009). Par ailleurs, l'acétylation de trois de ces résidus, les Lys380, Lys386 et Lys390, est impliquée dans l'interaction entre P-TEFb et Brd4 et pourrait jouer un rôle dans l'activation de P-TEFb par Brd4 (Schroder et al., 2012).

Comme nous l'avons évoqué, l'autophosphorylation du résidu Thr29 de CDK9 semble jouer un rôle inhibiteur de l'activité kinase de P-TEFb. En effet, cette modification, stimulée par Brd4 au sein du complexe d'initiation de la transcription, inhibe la transcription *in vitro* et *in vivo* (Zhou et al., 2009). Après le relargage de Brd4 à partir du complexe d'élongation, une phosphatase, possiblement PP2A, est recrutée au complexe d'élongation et déphosphoryle le résidu Thr29 de CDK9, ce qui permet la levée de l'inhibition de l'activité kinase de P-TEFb (Zhou et al., 2009).

Les résidus Lys44 et Lys48 de CDK9 sont acétylés par p300, GCN5 et PCAF (Fu et al., 2007; Sabo et al., 2008). Tandis que l'acétylation de la Lys48 semble réguler négativement l'activité de CDK9 (Sabo et al., 2008), l'acétylation de la Lys44 semble activer son activité (Fu et al., 2007). Ces résultats expérimentaux sont appuyés par une modélisation *in silico* de la structure cristallographique de CDK9 qui montre que l'ajout d'un groupement acétyle sur le résidu Lys48 interfère directement avec la liaison de l'ATP (Cho et al., 2010). En revanche, bien qu'elle régule l'activité de P-TEFb, l'acétylation de CDK9 n'a pas d'effet sur l'interaction de P-TEFb avec HEXIM1 ou le snARN 7SK (Fu et al., 2007; Sabo et al., 2008).

La phosphorylation de CDK9 sur le résidu Ser175 semble également jouer un rôle dans l'activité de P-TEFb, néanmoins, ce rôle reste très controversé. Il a été montré que la phosphorylation de ce résidu pourrait jouer un rôle positif dans l'activité kinase de P-TEFb (Chen et al., 2004; Yang et al., 2005). De plus, elle favoriserait l'interaction entre P-TEFb et Brd4 (Yang et al., 2005). Néanmoins, une autre étude a montré que la phosphorylation de ce résidu n'est nécessaire ni pour l'activité kinase de CDK9, ni pour l'association au sein de la snRNP 7SK (Li et al., 2005). Enfin, une dernière étude a montré que la déphosphorylation du résidu Ser175 de CDK9 par la phosphatase PP1 active P-TEFb et active la transcription du VIH-1 (Ammosova et al., 2011a).

d) Expression des sous-unités de P-TEFb

Comme nous l'avons évoqué, la kinase CDK9 et les CycT sont exprimées de façon ubiquitaire dans tous les tissus testés. Cependant, l'expression des différentes sous-unités de P-TEFb et notamment de la CycT1, peut être modulée suite à des stimuli. Ces variations sont un moyen efficace de réguler l'activité de P-TEFb.

L'expression de la CycT1 est, par exemple, sur-réglée lors de l'activation des lymphocytes T et lors de la différenciation des monocytes en macrophages. Dans ces cellules, l'activité kinase de P-TEFb suit les changements des niveaux de CycT1. D'une manière générale, la CycT2 et CDK9 sont exprimés à un niveau relativement élevé dans les monocytes et les lymphocytes T CD4⁺ naïfs et leur niveau reste constant lorsque les cellules se différencient en macrophages ou après l'activation des lymphocytes (Herrmann et al., 1998). En revanche, la CycT1 est exprimée à de faibles niveaux dans les monocytes et les lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Lors de l'activation des lymphocytes ou lorsque la différenciation des monocytes en macrophages est induite, l'expression de la CycT1 est fortement sur-réglée par un

mécanisme post-transcriptionnel (Garriga et al., 1998; Herrmann et al., 1998; Liou et al., 2006; Marshall et al., 2005; Sung and Rice, 2006, 2009). Cette augmentation des niveaux de CycT1 semble être requise pour l'induction d'un grand nombre d'ARNm cellulaires qui sont régulés au cours de la différenciation en macrophages (Yu et al., 2006). Le profil d'expression de la CycT1 dans des lymphocytes naïfs et des monocytes par rapport à son expression dans des lymphocytes activés et des macrophages suggère que la CycT1 pourrait être impliquée dans l'expression de gènes sur-régulés au cours de la différenciation en macrophage, l'activation des lymphocytes T ou plus généralement des conditions d'activité métabolique accrue (Yu et al., 2008).

Plusieurs éléments ont été identifiés comme régulant post-transcriptionnellement l'expression des cyclines T et de CDK9.

Le microARN miR-198 inhibe la traduction de l'ARNm de la CycT1 dans les monocytes primaires via plusieurs séquences dans sa région 3' UTR (Sung and Rice, 2009). Une diminution de l'expression de miR-198 est probablement impliquée dans la différenciation des monocytes en macrophages puisque qu'une augmentation de la CycT1 est un élément important de la différenciation des monocytes.

Par ailleurs, il a été montré que la protéine NF90 augmente l'initiation de la traduction de l'ARNm de la CycT1 en se liant sur un ou plusieurs sites dans sa région 3' UTR et en facilitant le recrutement de facteurs requis pour l'initiation de la traduction (Hoque et al., 2011). Ce mécanisme de régulation, contrairement à celui observé dans les monocytes se différenciant en macrophages (Sung and Rice, 2009), n'est pas dirigé par des microARN dans les types cellulaires analysés. Néanmoins, les mécanismes basés sur miR-198 et NF90 pourraient agir de concert dans d'autres types cellulaires.

Le microARN miR-15a régule négativement la CycT2. En ciblant la CycT2, miR-15a régule négativement la différenciation musculaire ainsi que les étapes précoces de la spermatogenèse (Teng et al., 2011).

Par ailleurs, il a été montré que le microARN miR-1, qui joue un rôle important dans le développement du cœur, cible la région 3' non traduite de l'ARNm de CDK9, inhibant ainsi sa traduction (Sayed et al., 2007; Takaya et al., 2009). Dans les cellules ES, miR-1 est soit absent soit difficilement détectable. Lorsque la différenciation en cellules cardiaques est induite, son expression augmente progressivement (Takaya et al., 2009). Il a été suggéré que miR-1 titre les effets de protéines régulatrices cardiaques pour contrôler la balance entre différenciation et prolifération au cours de la cardiogenèse (Zhao et al., 2005b). La régulation de l'expression de CDK9 est donc importante pour maintenir la croissance des cellules cardiaques dans des limites physiologiques.

3-Fonctions physiologiques

a) P-TEFb contrôle le passage de l'ARN pol II en élongation productive

Peu après le début de l'élongation, la progression de l'ARN pol II est bloquée au niveau d'un point de contrôle imposé par l'action concertée de deux facteurs négatifs d'élongation, DSIF et NELF (Yamaguchi et al., 1999). Ce point de contrôle sert à assurer l'ajout de la coiffe au pré-ARNm, et la phosphorylation de la Ser5 du CTD de l'ARN pol II favorise le recrutement des enzymes de « capping » à l'extrémité 5' du transcrit naissant (Cho et al., 1997; Ho and Shuman, 1999; McCracken et al., 1997a). Sans stimulation supplémentaire à cette étape, l'ARN pol II en pause va entrer en élongation abortive et ainsi terminer la transcription, ne générant que de courts transcrits. La libération de l'ARN pol II bloquée à ce point de contrôle requiert l'activité enzymatique de P-TEFb, qui phosphoryle la Ser2 du CTD de l'ARN pol II,

la sous-unité Spt5 de DSIF et la sous-unité NELF-E de NELF. Ces évènements de phosphorylation entraînent la dissociation de NELF et la conversion de DSIF en facteur positif d'élongation, qui, avec l'hyperphosphorylation de la Ser2 du CTD de l'ARN pol II, permettent l'entrée de l'ARN pol II en phase d'élongation productive (Renner et al., 2001; Wada et al., 1998b; Yamaguchi et al., 1999). P-TEFb reste ensuite associé à l'ARN pol II et voyage avec elle le long des gènes sur lesquels il est recruté (Byun et al., 2009). Une étude récente menée à l'échelle du génome entier a montré le rôle général de P-TEFb dans la régulation de la transcription. Ainsi, le traitement de cellules ES par un inhibiteur de CDK9, le flavopiridol, empêche la libération de l'ARN pol II du site de pause à proximité du promoteur sur la plupart des gènes actifs (Rahl et al., 2010).

b) Rôle de P-TEFb dans la maturation des ARNm

En plus de son rôle dans la stimulation de l'élongation de la transcription, P-TEFb joue un rôle essentiel dans la maturation co-transcriptionnelle des pré-ARNm et les modifications de la structure de la chromatine, en favorisant le recrutement de facteurs impliqués dans l'épissage et la maturation en 3', ainsi que des enzymes de modification de la chromatine.

La phosphorylation de la Ser2 du CTD et de la sous-unité Spt5 de DSIF par CDK9 favorise notamment le recrutement d'enzymes de modifications des histones. P-TEFb régule donc indirectement plusieurs types de modification des histones telles que la tri-méthylation de H3K36, la tri-méthylation de H3K4 et la monoubiquitination de H2B (Pirngruber et al., 2009a).

Par ailleurs, P-TEFb pourrait jouer un rôle dans le couplage entre l'élongation de la transcription et l'épissage des pré-ARNm. Ainsi, le facteur d'épissage U2AF65 interagit directement avec le CTD phosphorylé de l'ARN pol II. Cette interaction favorise le recrutement d'un complexe constitué des facteurs d'épissage U2AF65 et PRP19C au pré-ARNm, stimulant ainsi l'épissage co-transcriptionnel du pré-ARNm naissant (David et al., 2011). De même, la phosphorylation de la Ser2 du CTD par P-TEFb peut favoriser l'inclusion d'un exon alternatif en facilitant le recrutement du facteur d'épissage SR SF2/ASF et probablement d'autres protéines SR au niveau de l'ARN pol II. De plus, la désintégration de la snRNP 7SK dans des embryons de poisson zèbre entraîne un changement significatif dans l'accumulation de différents variants d'épissage de deux gènes dont le patron d'épissage est normalement régulé au cours du développement (Barboric et al., 2009).

c) Rôle de P-TEFb dans l'élongation de la transcription

La phosphorylation de la sous-unité Spt5 de DSIF par P-TEFb convertit ce facteur négatif d'élongation en facteur positif d'élongation de la transcription (Ping and Rana, 2001; Wada et al., 1998b; Yamada et al., 2006). P-TEFb phosphoryle les résidus Thr4 au sein d'un motif répété (consensus, Gly-Ser-Arg/Gln-Thr-Pro) localisé dans la région carboxy-terminale de Spt5, conservé au cours de l'évolution (Yamada et al., 2006). Cette phosphorylation de DSIF est essentielle pour l'élongation de la transcription par l'ARN pol II (Yamada et al., 2006). De plus, il a récemment été montré que la phosphorylation de Spt5 par P-TEFb est nécessaire pour la stimulation de l'élongation de la transcription par DSIF, PAF1c et Tat-SF1 (Chen et al., 2009; Liu et al., 2009). En effet, *in vivo*, ces trois facteurs d'élongation sont recrutés au niveau du gène de façon coordonnée et collaborent pour stimuler l'élongation de la transcription par l'ARN pol II (Chen et al., 2009). Or, *in vitro*, en présence d'un inhibiteur de P-TEFb, la stimulation de l'élongation de la transcription par ces trois facteurs est fortement inhibée (Chen et al., 2009). La phosphorylation de DSIF par P-TEFb est donc essentielle pour la stimulation de l'élongation par DSIF, Tat-SF1 et PAF1c.

Par ailleurs, l'histone linker H1 a récemment été identifiée comme un nouveau substrat de P-TEFb (O'Brien et al., 2010). Or, cette histone qui se lie aux séquences ADN situées entre les nucléosomes facilite la compaction de la chromatine. La phosphorylation de l'histone H1 sur des résidus spécifiques est associée à une augmentation de sa mobilité et une décondensation de la chromatine (Alexandrow and Hamlin, 2005; Catez et al., 2006). Ainsi, l'inhibition de l'activité de P-TEFb entraîne une diminution de la phosphorylation de la Ser183 de l'histone H1, corrélée avec une augmentation de l'association de l'histone H1 au site d'initiation de la transcription et dans la région codante de gènes cellulaires (O'Brien et al., 2010). En revanche, une augmentation de la quantité de P-TEFb libre entraîne une augmentation des niveaux d'histone H1 phosphorylée corrélée avec une diminution de l'association de l'histone H1 au site d'initiation de la transcription et dans la région codante (O'Brien et al., 2010; O'Brien et al., 2012). Ainsi, P-TEFb pourrait phosphoryler l'histone H1 de façon concomitante avec la progression de l'ARN pol II, entraînant la dissociation de l'histone H1 de l'ADN, et facilitant la progression de la machinerie transcriptionnelle, ce qui augmenterait la processivité de l'élongation de la transcription par l'ARN pol II.

d) Rôle de P-TEFb dans le développement et la différenciation cellulaire

La protéine HEXIM1, en collaboration avec le snARN 7SK, séquestre P-TEFb inhibant ainsi son activité kinase. Or, au cours de la différenciation induite par le HMBA (pour Hexaméthylène Bisacétamide), de cellules musculaires lisses vasculaires et de cellules érythroleucémiques murines, la protéine HEXIM est surexprimée (He et al., 2006; Ouchida et al., 2003; Turano et al., 2006). De même, l'induction de la différenciation des cellules de neuroblastome par l'acide rétinolique entraîne la sur-régulation d'HEXIM1. L'expression ectopique d'HEXIM1 entraîne une inhibition de la croissance et favorise la différenciation neuronale (Turano et al., 2006). Par ailleurs, HEXIM joue un rôle d'inhibiteur de croissance dans les myocytes cardiaques. En effet, la délétion de CLP-1, l'homologue murin d'HEXIM, chez la souris entraîne l'élargissement des cellules cardiaques, ce qui entraîne une hypertrophie du cœur (Huang et al., 2004). Tous ces résultats soulignent un rôle crucial d'HEXIM au cours de la différenciation cellulaire. Cela suggère que l'inactivation de P-TEFb pourrait jouer un rôle important au cours de la transition des cellules d'un état prolifératif vers un état différencié.

Par ailleurs, l'activité de P-TEFb est nécessaire pour la différenciation des cellules musculaires squelettiques (Giacinti et al., 2006; Simone et al., 2002). En effet, dans les cellules musculaires squelettiques murines, le complexe P-TEFb (CDK9/CycT2) est recruté au niveau des promoteurs de gènes spécifiques de la différenciation par MyoD et MEF2, deux facteurs de transcription majeurs de la différenciation musculaire (De Falco and De Luca, 2006; Giacinti et al., 2006; Nojima et al., 2008; Simone et al., 2002). Or, lors de la différenciation de ces cellules, P-TEFb est libéré de la snRNP 7SK dans les 30 premières minutes d'induction de la différenciation, se ré-associe après deux heures d'induction (Nojima et al., 2008), puis la proportion de P-TEFb séquestrée au sein de la snRNP 7SK augmente jusqu'à devenir plus élevée que dans les cellules non induites au bout de 24h d'induction et enfin l'équilibre entre formes active et inactive de P-TEFb semble revenir à la normale au bout de 72h d'induction (Galatioto et al., 2010). Il apparaît donc que l'équilibre entre les formes active et inactive de P-TEFb, au cours de la différenciation des cellules musculaires squelettiques murines, est, dans un premier temps, déplacé rapidement mais transitoirement vers la forme active puis re-déplacé vers la forme inactive au cours de la différenciation. Or, le recrutement de P-TEFb aux promoteurs de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire par le facteur de transcription MEF-2 survient dans les 30 minutes qui suivent le début de l'induction de la différenciation, ce qui coïncide avec la libération de P-TEFb de la

snRNP 7SK (Nojima et al., 2008). Ces résultats suggèrent que l'augmentation transitoire du niveau de P-TEFb libre, liée au désassemblage de la snRNP 7SK dans les 30 minutes suivant le début de l'induction de la différenciation, permet une augmentation transitoire de la transcription dépendante de MEF-2. Cela permet la mise en place du programme de différenciation dans les cellules musculaires squelettiques murines.

P-TEFb peut également être recruté par d'autres facteurs de transcription spécifiques au promoteur de gènes impliqués dans divers programmes de différenciation cellulaire. Il a par exemple été montré que PPAR γ recrute P-TEFb pour activer la transcription et promouvoir l'adipogenèse (différenciation en adipocytes) (Iankova et al., 2006). Par ailleurs, l'association de P-TEFb avec GATA1, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation de nombreuses lignées hématopoïétiques, est indispensable pour une mégakaryocytopoïèse efficace (Elagib et al., 2008). Le complexe P-TEFb (CDK9₅₅/CycT2) joue un rôle essentiel dans la régénération musculaire en dirigeant la différenciation des myoblastes à partir des cellules satellites, une population spécialisée de cellules souches myogéniques, *in vivo* (Giacinti et al., 2008). Enfin, l'interaction de CDK9 avec GATA4 est importante pour la différenciation des cellules ES de souris en cardiomyocytes (Kaichi et al., 2011). Comme cela a été montré dans le cas de la différenciation des cellules musculaires squelettiques murines, on peut émettre l'hypothèse que les signaux induisant la différenciation dans ces autres types cellulaires activent des voies de signalisation qui entraînent le désassemblage de la snRNP 7SK contenant P-TEFb. Le facteur P-TEFb libéré de la snRNP 7SK peut alors être recruté au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans la différenciation par les différents facteurs de transcription spécifiques qui ont été décrits afin d'activer leur transcription.

De son côté, Brd4, le régulateur positif et facteur de recrutement de P-TEFb, jouerait un rôle dans la stimulation de la croissance cellulaire. Ainsi, chez la souris, la délétion des deux allèles de Brd4 entraîne une létalité embryonnaire, tandis que les individus hétérozygotes Brd4^{+/-} présentent des défauts de croissance pré- et postnataux associés à un taux de prolifération des cellules réduit (Houzelstein et al., 2002). Dans des cultures primaires, les cellules Brd4^{+/-} montrent également des défauts de prolifération.

Des modifications dans l'équilibre entre les formes active et inactive de P-TEFb peuvent donc affecter la croissance cellulaire, la prolifération et la différenciation. Cet équilibre doit donc être finement régulé pour répondre aux besoins de la cellule.

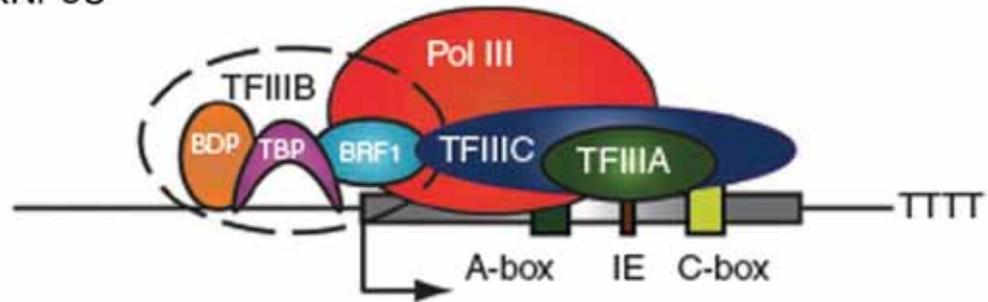
Etant donné le rôle majeur de P-TEFb dans la prolifération et la différenciation cellulaire, plusieurs études se sont penchées sur son rôle physiologique au cours du développement. Ainsi, il a été montré que la diminution de l'expression de CDK9 chez la drosophile entraîne une létalité au cours de la métamorphose, suggérant un rôle fondamental de P-TEFb chez la drosophile au cours du développement précoce (Eissenberg et al., 2007). De plus, une délétion de la CycT2 chez la souris entraîne une létalité embryonnaire précoce, soulignant son rôle essentiel pour le développement (Kohoutek et al., 2009).

e) Implication de P-TEFb dans la maturation en 3' des ARNm des histones

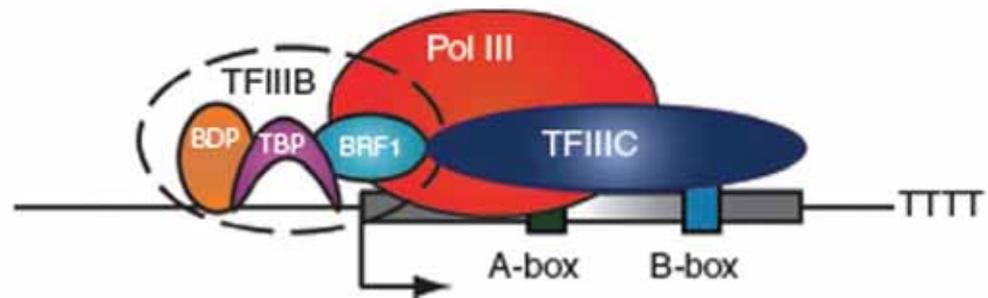
En plus de son rôle dans la levée de la pause transcriptionnelle à proximité du promoteur, le complexe P-TEFb a récemment été impliqué dans la maturation en 3' des pré-ARNm des histones canoniques.

Une diminution de l'expression de CDK9 dans une lignée cellulaire humaine entraîne un défaut de clivage des pré-ARNm des histones canoniques en 3' à cause d'un défaut de recrutement de facteurs de maturation de l'extrémité 3' des ARNm des histones. L'ARN pol II poursuit alors la transcription jusqu'à un signal de polyadénylation alternatif, ce qui entraîne une accumulation d'ARNm d'histones polyadénylés (Pirngruber et al., 2009b). Or, les histones canoniques H2A, H2B, H3 et H4 sont codées par des gènes répliation-

Type 1: ARNr 5S



Type 2: exemple : ARNt



Type 3: exemple : snARN U6, RNase P, snARN 7SK, ...

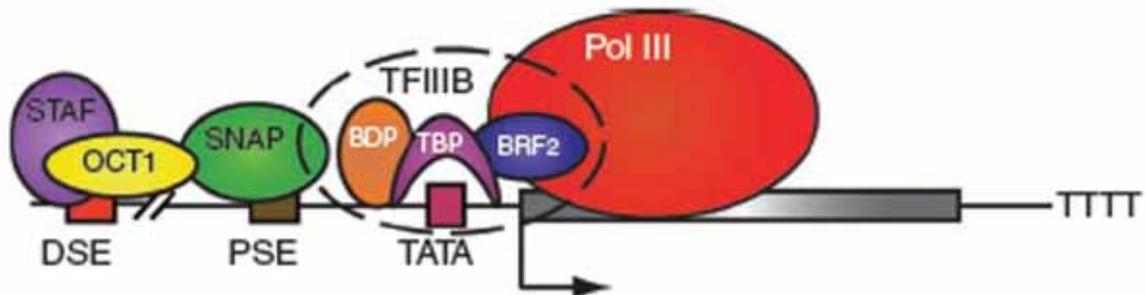


Figure 22 : Les différents types de promoteurs reconnus par l'ARN pol III

Les promoteurs des gènes transcrits par l'ARN pol III sont classés en trois types sur la base des éléments de séquence les constituant et des facteurs de transcription s'y associant.

Les promoteurs de type 1 contiennent une région de contrôle interne (ICR) qui peut être divisée en trois éléments : une boîte A, un élément intermédiaire (IE) et une boîte C. Les promoteurs de type 2 consistent en une boîte A et une boîte B. Tandis que les promoteurs de type 1 et 2 sont internes à la séquence codante, les promoteurs de type 3 sont situés exclusivement en amont du site d'initiation de la transcription. Ce dernier type de promoteur contient un élément de séquence distal (DSE), un élément de séquence proximal (PSE) et une boîte TATA.

dépendants produisant des ARNm qui, contrairement à la plupart des ARNm synthétisés par l'ARN pol II, ne sont pas polyadénylés. Ces ARNm non polyadénylés se terminent par une structure en tige-boucle conservée qui guide le clivage endo-nucléolytique de l'extrémité 3' du pré-ARNm. Cette maturation en 3' requiert un ensemble complexe de facteurs conservés au cours de l'évolution (Marzluff et al., 2008). Or, une étude récente a montré que le recrutement de ces facteurs de maturation au niveau des gènes codants pour les histones est facilité par la phosphorylation de la Thr4 du CTD de l'ARN pol II. Cette phosphorylation est donc requise pour la formation de l'extrémité 3' des ARNm des histones canoniques (Hsin et al., 2011). Les auteurs ont montré que la phosphorylation de la Thr4 du CTD est fortement inhibée lors d'un traitement par des inhibiteurs de P-TEFb, le DRB et le flavopiridol, indiquant que cette phosphorylation requiert l'activité kinase de la CDK9 du complexe P-TEFb (Hsin et al., 2011).

La Thr4 du CTD de l'ARN pol II est donc une nouvelle cible de l'activité kinase de P-TEFb qui joue un rôle spécifique dans l'expression d'un type de gènes particulier.

I-2) Le snARN 7SK

Le snARN 7SK humain est un snARN de 331 nucléotides très structuré et très abondant avec environ 2.10^5 copies par cellule (Wassarman and Steitz, 1991). Tandis que de nombreux pseudogènes ont été identifiés, le snARN 7SK est synthétisé par l'ARN pol III à partir d'un locus unique situé sur le chromosome 6 (Driscoll et al., 1994). Le promoteur du gène codant le snARN 7SK, tout comme celui du gène codant le snARN U6, est un promoteur de type 3. Les promoteurs reconnus par l'ARN pol III peuvent être divisés en 3 types sur la base des éléments de séquence les constituant et des facteurs de transcription qui leur sont associés. Les promoteurs de type 1 et 2 sont internes à la séquence codante et dépourvus de boîte TATA (figure 22). Par contre, les promoteurs de type 3 sont situés exclusivement en amont du site d'initiation de la transcription et possèdent une boîte TATA (Schramm and Hernandez, 2002). Au sein du promoteur du gène codant le snARN 7SK, qui est donc exclusivement externe à la séquence codante, trois éléments nécessaires pour une transcription efficace ont été identifiés (Schramm and Hernandez, 2002), un DSE (pour Distal Sequence Element), un PSE (pour Proximal Sequence Element) et une boîte TATA. Le signal de terminaison de la transcription par l'ARN pol III est une simple série d'au moins quatre thymidines sur le brin codant (Bogenhagen and Brown, 1981). L'ARN pol III reconnaît efficacement et en l'absence d'autres facteurs cette série de T (Allison and Hall, 1985; Bogenhagen and Brown, 1981; Cozzarelli et al., 1983). Les transcrits pol III présentent donc à leur extrémité 3'-OH une série d'uridines reconnue par la protéine La, dont la liaison stabilise ces ARN nouvellement synthétisés en les protégeant contre la dégradation par des exonucléases (Bayfield et al., 2010). Néanmoins, cette protéine ne s'associe que transitoirement avec les transcrits pol III naissants et n'est pas retrouvée dans les RNP matures. La protection de l'extrémité 3'-OH du snARN 7SK naissant est donc assurée par la protéine La, tandis que la protection de l'extrémité 3'-OH du snARN 7SK au sein des RNP matures est assurée par la protéine LARP7. En effet, comme nous le verrons dans le paragraphe qui lui est consacré, la protéine LARP7 se lie à l'extrémité 3'-OH d'environ 90% des molécules de snARN 7SK (Krueger et al., 2008). De plus, les protéines La et LARP7 se lient au snARN 7SK de façon mutuellement exclusive (Markert et al., 2008). Plusieurs études permettent aujourd'hui de proposer un modèle expliquant le transfert du snARN 7SK de la protéine La à la protéine LARP7. Post-transcriptionnellement, des nucléases éliminent une, deux ou trois uridines de l'extrémité 3'-OH du snARN 7SK qui est ensuite adénylée par une enzyme non identifiée à ce jour (Sinha et al., 1998). A l'équilibre, la séquence de l'extrémité 3'-OH du snARN 7SK est un mélange de ...UCUA, ...UCUUA, ...UCUUUA, donnant une taille totale au snARN 7SK pouvant varier

de 330 à 332 nucléotides, 331 nucléotides étant la taille la plus courante. Environ 70% du snARN 7SK est adénylé post-transcriptionnellement à l'extrémité 3' (Sinha et al., 1998). Or, il a été montré que cette modification affecte la liaison de la protéine La à d'autres snARN synthétisés par l'ARN pol III (Chen et al., 1998). Cette modification pourrait donc être un mécanisme permettant la libération du snARN 7SK par la protéine La. Par ailleurs, contrairement à la plupart des transcrits pol III, le snARN 7SK possède une coiffe γ -monométhyle phosphate (Shumyatsky et al., 1990). Or, il a été montré que ce type de coiffe diminue l'affinité de la protéine La pour d'autres snARN synthétisés par l'ARN pol III (Bhattacharya et al., 2002). L'ajout de la coiffe γ -monométhyle phosphate pourrait donc également jouer un rôle dans la libération du snARN 7SK par la protéine La. Au jour d'aujourd'hui, cette coiffe γ -monométhyle phosphate particulière n'a été identifiée que dans trois autres petits ARN synthétisés par l'ARN pol III, U6, l'ARN B2 de rongeurs et l'ARN U3 des plantes (Liu et al., 1992; Shimba et al., 1992; Shumyatsky et al., 1990). L'addition de cette coiffe est essentielle pour protéger l'ARN contre la dégradation par des exonucléases. En effet, il a été montré que cette coiffe augmente la stabilité des snARN U6 et 7SK et que le snARN U6 non coiffé est rapidement dégradé (Shumyatsky et al., 1993). L'enzyme ajoutant sa coiffe à l'extrémité 5' du snARN 7SK a récemment été identifiée comme étant la protéine MePCE (Jeronimo et al., 2007). Néanmoins, MePCE ne joue pas seulement un rôle dans l'ajout de la coiffe au snARN 7SK. En effet, après avoir coiffé le snARN 7SK, elle reste associée stablement avec lui. MePCE favorise alors la liaison de LARP7 au snARN 7SK. Au sein du sous-complexe stable MePCE-LARP7-7SK ainsi formé, MePCE et LARP7 interagissent et coopèrent pour stabiliser le snARN 7SK et maintenir l'intégrité des snRNP 7SK (Xue et al., 2010).

La séquence du snARN 7SK est conservée entre les métazoaires au cours de l'évolution, et plus particulièrement, elle est très conservée entre les vertébrés (Marz et al., 2009). La première structure secondaire proposée pour le snARN 7SK par Wassarman et Steitz, déterminée par sondage enzymatique et chimique, contient quatre structures en tige-boucle (ou épingles à cheveux) majeures séparées par des régions simple brin (figure 23) (Wassarman and Steitz, 1991). Plus récemment, un nouveau modèle de structure secondaire, basé sur une étude détaillée de la conservation du snARN 7SK au cours de l'évolution, a été proposé. Dans cette étude, l'alignement global des séquences du snARN 7SK issues de divers organismes a permis de proposer une structure alternative pour le snARN 7SK. Dans cette structure, les quatre tige-boucles majeures du modèle de Wassarman et Steitz sont globalement conservées, mais ce modèle suggère une certaine compaction de l'ARN (Marz et al., 2009). La principale différence par rapport à la structure proposée par Wassarman et Steitz est un appariement entre l'extrémité 5' du snARN 7SK et une région située environ 300 nucléotides en aval, juste en amont de la dernière tige-boucle (Marz et al., 2009) (figure 24). Cet appariement rapprocherait les extrémité 3' et 5' du snARN 7SK, ce qui pourrait favoriser certaines interactions protéine-protéine au sein des snRNP 7SK, et notamment l'interaction entre MePCE et LARP7. En effet, LARP7 se lie au snARN 7SK via son extrémité 3'-OH (He et al., 2008; Krueger et al., 2008), tandis que MePCE ajoute une coiffe γ -monométhyle phosphate au snARN 7SK (Jeronimo et al., 2007), et interagit donc probablement avec son extrémité 5'. Le rapprochement des extrémités 5' et 3' du snARN 7SK pourrait donc favoriser la formation du sous-complexe stable MePCE-LARP7-7SK.

La formation de la snRNP 7SK qui séquestre et inactive P-TEFb, dont le snARN 7SK est un composant structural majeur, nécessite de complexes interactions ARN-protéines. Une étude menée *in vivo*, utilisant une série de mutants du snARN 7SK portant des altérations ou des troncations de séquences, a montré que la séquestration de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK

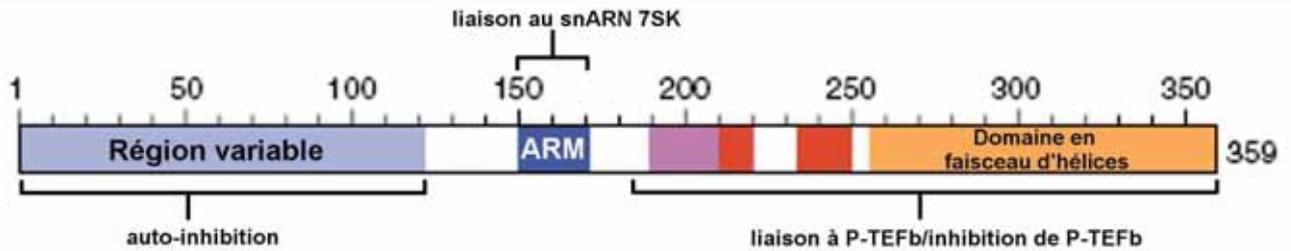


Figure 25 : Domaines fonctionnels de la protéine HEXIM1

La région amino-terminale unique à HEXIM1 fonctionne comme un domaine auto-inhibiteur. Le motif riche en arginines (ARM) permet la liaison d'HEXIM au snARN 7SK. Le domaine carboxy-terminal d'HEXIM permet la liaison à P-TEFb et l'inhibition de son activité kinase. Au sein de ce domaine, la région très conservée (en rose) est impliquée dans l'inhibition de l'activité kinase de P-TEFb. Les régions riches en résidus acides (en rouge) interagiraient avec les résidus basiques du domaine ARM adjacent prévenant ainsi la liaison prématurée d'HEXIM à P-TEFb en l'absence du snARN 7SK. Enfin, le domaine en faisceau d'hélices est impliqué dans la dimérisation d'HEXIM et dans la liaison aux boîtes cyclines des CycT1 et CycT2.

nécessite la liaison d'un dimère d'HEXIM sur le segment G24-C48/G60-C87 de la tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK (Egloff et al., 2006). La liaison d'HEXIM est un pré-requis pour l'association de P-TEFb. En effet, HEXIM interagit directement et spécifiquement avec la CycT1 et inhibe l'activité kinase de P-TEFb uniquement en présence du snARN 7SK (Michels et al., 2004; Michels et al., 2003). Enfin, P-TEFb s'associe également avec le segment G302-C324 de la tige-boucle située à l'extrémité 3' du snARN 7SK, rendant cette structure essentielle à la séquestration de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK (Egloff et al., 2006).

Lorsque P-TEFb et HEXIM se dissocient de la snRNP 7SK, un autre groupe de facteurs, les hnRNP, s'associent au sous-complexe stable MePCE-LARP7-7SK. Lorsque P-TEFb et HEXIM sont libérés, le snARN 7SK subit un changement conformationnel (Krueger et al., 2010). Or, étant donné que HEXIM se lie étroitement au snARN 7SK *in vitro*, ce changement conformationnel pourrait contribuer à diminuer l'affinité entre HEXIM et le snARN 7SK dans les cellules. Les hnRNP pourraient alors stabiliser cette conformation du snARN 7SK excluant HEXIM (Krueger et al., 2010).

I-3) Les protéines HEXIM

La protéine HEXIM1 (pour Hexamethylene Bisacétamide Inducible protein), initialement nommée MAQ1 (pour Ménage à Quatre) ou CLP-1 chez la souris (pour Cardiac Lineage Protein) et plus tard EDG-1 (pour Estrogen Downregulated Gene), est une protéine nucléaire qui inhibe l'activité kinase de P-TEFb de façon dépendante du snARN 7SK. HEXIM est conservée au cours de l'évolution entre les métazoaires et a vraisemblablement co-évolué avec le snARN 7SK (Marz et al., 2009). Dans plusieurs espèces, incluant les eucaryotes inférieurs, il n'existe qu'une seule protéine HEXIM. En revanche, chez la plupart des euthériens et chez certains métathériens, il existe deux homologues, HEXIM1 et HEXIM2 (Marz et al., 2009). Ces deux protéines de 41 et 32 kDa respectivement, sont exprimées ubiquitairement à partir de gènes adjacents situés sur le chromosome 17. L'alignement de séquence entre ces deux protéines montre qu'elles présentent une forte homologie (>50% d'identité) dans leurs régions centrale et carboxy-terminale (Byers et al., 2005; Yik et al., 2005). Au contraire, les séquences de leur région amino-terminale ne sont pas apparentées. Il a été montré que la partie amino-terminale unique à HEXIM1 joue un rôle auto-inhibiteur. En effet, la délétion de cette région forme une protéine HEXIM1 mutante qui cible et inactive P-TEFb avec une plus forte efficacité que la protéine sauvage (Yik et al., 2003). Néanmoins, les protéines HEXIM1 et HEXIM2 pourraient avoir des fonctions redondantes. En effet, la proportion d'HEXIM2 associée avec P-TEFb augmente lorsque l'expression d'HEXIM1 est diminuée (Byers et al., 2005; Yik et al., 2005). Ces observations suggèrent que tandis que les deux protéines HEXIM homologues ont probablement des fonctions physiologiques et/ou des mécanismes d'action similaires, elles pourraient être régulées différemment à travers la région amino-terminale unique à HEXIM1. De plus, les deux homologues d'HEXIM présentent des patrons d'expression différents entre différents tissus (Byers et al., 2005; Yik et al., 2005). Les protéines HEXIM1 et 2 forment des homo ou hétéro-dimères stables.

Les protéines HEXIM peuvent être divisées en plusieurs domaines majeurs (figure 25). Ainsi, à l'extrémité carboxy-terminale se trouvent deux régions en faisceau d'hélices (coiled-coil) impliquées dans la dimérisation d'HEXIM et dans la liaison aux boîtes cyclines des CycT1 et CycT2 (Barboric et al., 2005; Blazek et al., 2005; Dames et al., 2007; Michels et al., 2003; Yik et al., 2003). En se rapprochant du centre de la protéine, se trouvent deux régions acides, suivies par un motif très conservé impliqué dans l'interaction avec les cyclines et l'inhibition de P-TEFb (Byers et al., 2005; Michels et al., 2004). Enfin, toujours dans la région centrale, se trouve le domaine de liaison au snARN 7SK qui fait partie du signal de localisation

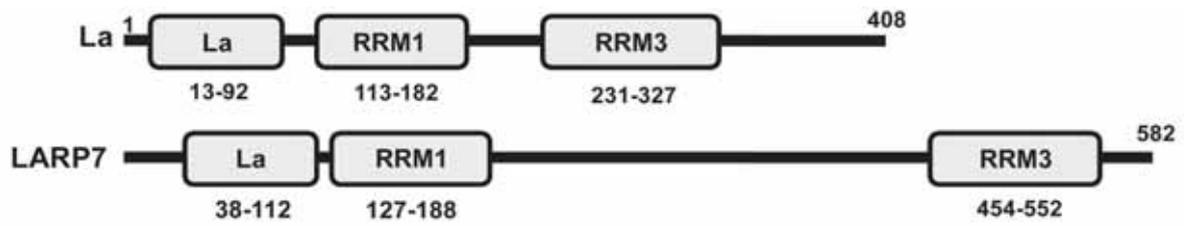


Figure 26 : Comparaison schématique des domaines retrouvés dans les protéines La et LARP7 (tiré de Krueger et al, 2008)

Les protéines La et LARP7 présentent une forte homologie dans leur région amino-terminale et en particulier dans leur domaine La constitué des motif La et RRM1 (RNA Recognition Motif 1).

RRM3 : RNA Recognition Motif 3

nucléaire de la protéine. Le domaine de liaison au snARN 7SK est une région basique composée de motifs riches en arginines (ARM) (Michels et al., 2004; Yik et al., 2004). Cette région basique est identique pour les protéines HEXIM1 et HEXIM2 chez l'Homme, et est très conservée entre les métazoaires au cours de l'évolution. En l'absence du snARN 7SK, cette région basique pourrait adopter une conformation auto-inhibitrice en établissant des interactions électrostatiques avec les deux régions acides adjacentes. Une telle conformation empêcherait la liaison d'HEXIM à P-TEFb en l'absence du snARN 7SK. La liaison du snARN 7SK à la région basique d'HEXIM neutraliserait ses charges, rompant l'interaction intramoléculaire entre les régions de charges opposées au sein de la région centrale d'HEXIM. Le changement conformationnel induit par la libération de la région acide lors de la liaison au snARN 7SK permettrait alors l'interaction d'HEXIM avec la CycT (Barboric et al., 2005). La liaison d'HEXIM à la CycT *in vitro* n'entraîne pas automatiquement l'inhibition de l'activité kinase de CDK9 (Li et al., 2005). En effet, *in vitro*, la mutation des résidus Phe 208 et Tyr271 d'HEXIM n'empêche pas sa liaison à P-TEFb médiée par le snARN 7SK, mais, le complexe ainsi formé reste actif. Il a donc été suggéré que ces résidus pourraient bloquer le site de liaison de l'ATP au sein de CDK9.

I-4) La protéine LARP7

La protéine LARP7 (pour La-related Protein 7) ou PIP7S (pour P-TEFb Interaction Protein for 7SK Stability) est une protéine de 67 kDa contenant 582 acides aminés qui s'associe à environ 90% des molécules de snARN 7SK *in vivo* (He et al., 2008; Krueger et al., 2008). LARP7 se lie directement et stablement au snARN 7SK. Ainsi, cette protéine reste associée avec le snARN 7SK après la libération de P-TEFb et HEXIM causée par le stress ou des signaux cellulaires (He et al., 2008; Krueger et al., 2008).

LARP7 présente une forte homologie avec la protéine La humaine (hLa) dans sa région amino-terminale et en particulier dans son domaine La constitué des motifs La et RRM1, mais leurs régions carboxy-terminales divergent (figure 26) (He et al., 2008). La protéine hLa s'associe à l'extrémité 3'-UUU-OH des transcrits pol III naissants via son domaine La, les protégeant ainsi contre la dégradation par des exonucléases 3'→5'. La protéine LARP7 partage avec la protéine hLa tous les résidus du motif La préalablement identifiés comme étant impliqués dans la reconnaissance spécifique de l'extrémité 3'-UUU-OH des ARN (Kotik-Kogan et al., 2008; Teplova et al., 2006). Ainsi, le motif La de LARP7 peut être remplacé par le motif La de la protéine hLa sans que cela n'affecte significativement sa liaison au snARN 7SK ni la formation de la snRNP 7SK *in vivo* (He et al., 2008). De plus, le domaine La de LARP7, lorsque séparé de la région carboxy-terminale de la protéine, est capable de compléter partiellement la perte de fonction de la protéine La chez *S. pombe* en assurant la protection de l'extrémité 3' des ARN normalement protégés par la protéine La (He et al., 2008). Or, contrairement à la protéine La qui s'associe à de nombreux transcrits présentant une extrémité 3'-UUU-OH, la protéine LARP7 s'associe majoritairement au snARN 7SK et dans une moindre mesure au snARN U6 de la machinerie d'épissage (Krueger et al., 2008). La région carboxy-terminale de LARP7 pourrait donc jouer un rôle dans la détermination de sa spécificité de liaison au snARN 7SK. Ainsi, il a été montré *in vivo* qu'une délétion, même minime, de la région carboxy-terminale de LARP7 abolit presque totalement la liaison au snARN 7SK (He et al., 2008). Néanmoins, d'autres études ont montré que *in vitro* la délétion de la région carboxy-terminale de la protéine LARP7 ou des mutations ponctuelles au sein de cette région n'affectent pas significativement la liaison de LARP7 au snARN 7SK (Barboric et al., 2009; Markert et al., 2008). Il est donc probable que *in vivo*, la région carboxy-terminale de LARP7 soit indispensable pour augmenter sa spécificité de liaison au snARN 7SK et limiter sa liaison à d'autres ARN possédant une extrémité 3'-UUU-

OH. Par ailleurs, le motif RRM1 de LARP7 semble également impliqué dans sa spécificité de liaison au snARN 7SK. En effet, un remplacement du motif RRM1 de LARP7 par le motif RRM1 de hLa entraîne une diminution significative de sa liaison au snARN 7SK et de la formation de la snRNP 7SK *in vivo* (He et al., 2008).

En se liant à son extrémité 3'-UUU-OH, la protéine LARP7 stabilise le snARN 7SK en le protégeant contre la dégradation par des exonucléases. Ainsi, la diminution de la quantité de LARP7 par ARNi entraîne une diminution des niveaux de snARN 7SK, qui résulte en une diminution des niveaux de snRNP 7SK contenant P-TEFb (He et al., 2008; Krueger et al., 2008). Cela entraîne une augmentation faible mais significative des niveaux de P-TEFb libre dans les cellules (Krueger et al., 2008), causant une augmentation de la transcription dépendante de P-TEFb (Krueger et al., 2008; Markert et al., 2008) avec des effets biologiques conséquents (He et al., 2008), comme nous le verrons dans le chapitre IV.

Par ailleurs, LARP7 faisant partie de la snRNP 7SK contenant P-TEFb, elle interagit avec HEXIM, P-TEFb et MePCE. Or, l'interaction de LARP7 avec HEXIM et P-TEFb semble principalement médiée par le snARN 7SK. En effet, la dégradation du snARN 7SK par un traitement à la RNase A abolit l'interaction de LARP7 avec P-TEFb et HEXIM (Barboric et al., 2009; He et al., 2008; Markert et al., 2008; Xue et al., 2010) mais n'affecte pas son interaction avec MePCE (Barboric et al., 2009; Xue et al., 2010). Le snARN 7SK est donc requis pour l'interaction stable entre LARP7, P-TEFb et HEXIM au sein de la snRNP 7SK. Néanmoins, des analyses d'interactions *in vitro* menées avec des protéines recombinantes ont montré une interaction directe de CDK9 et HEXIM1 avec LARP7 (Markert et al., 2008). De plus, la région carboxy-terminale de LARP7 est suffisante pour lier CDK9 *in vitro*. Ainsi, des interactions protéine-protéine contribuent probablement à maintenir la stabilité de la snRNP 7SK contenant P-TEFb, bien que la liaison de LARP7 à cette snRNP soit principalement médiée par sa liaison au snARN 7SK.

Par ailleurs, au sein de la snRNP 7SK, il existe donc une interaction stable, indépendante du snARN 7SK entre LARP7 et MePCE. Or, LARP7 inhibe l'activité catalytique de MePCE. En effet, il a été montré qu'une fois liée à LARP7, MePCE n'est plus capable de coiffer un ARN 7SK recombinant (Xue et al., 2010). L'inhibition de l'activité de MePCE par LARP7 pourrait être due à l'occupation de son site catalytique par certains résidus de LARP7 lorsque les deux protéines s'associent au sein de la snRNP 7SK. En effet, la mutation de trois résidus très conservés au sein du site catalytique de MePCE, abolissant complètement son activité catalytique, réduit significativement l'interaction entre LARP7 et MePCE. Il est possible que cette mutation au niveau du site catalytique de MePCE abolisse un point de contact important entre les deux protéines (Xue et al., 2010).

I-5) La protéine MePCE

Précédemment appelée BCDIN3 (pour Bicoid-interacting 3, homologue [*Drosophila*]), MePCE (pour methylphosphate capping enzyme) est une protéine de 74 kDa qui contient 689 acides aminés (Jeronimo et al., 2007). Cette protéine, qui a tout d'abord été identifiée comme une protéine associée à P-TEFb, est une méthyltransférase S-adénosylméthionine-dépendante qui ajoute un monométhyle sur le phosphate en position γ du premier nucléotide à l'extrémité 5' du snARN 7SK (Jeronimo et al., 2007). MePCE est essentielle pour la stabilité du snARN 7SK. En effet, *in vivo*, une diminution de la quantité de MePCE par ARNi entraîne une diminution des niveaux de snARN 7SK cellulaire (Barboric et al., 2009; Jeronimo et al., 2007; Xue et al., 2010), causant une réduction des niveaux de snRNP 7SK contenant P-TEFb et donc une augmentation des niveaux de P-TEFb libre (Barboric et al., 2009). Cela entraîne une stimulation de la transcription d'un gène rapporteur (Barboric et al., 2009). MePCE

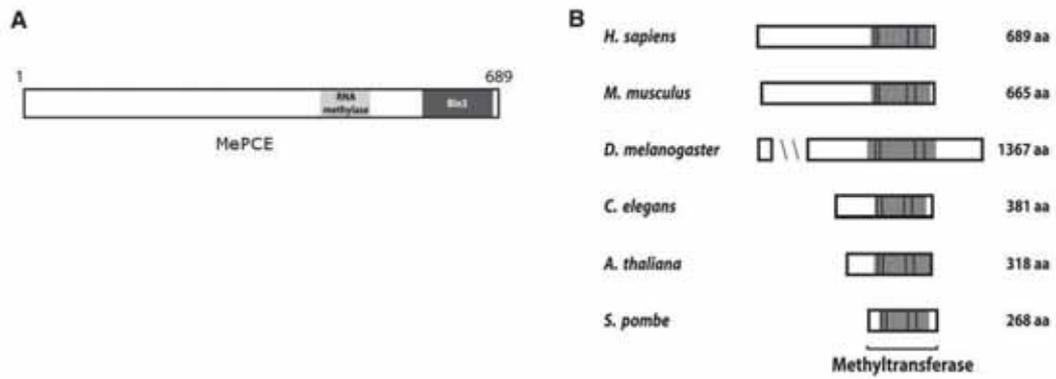


Figure 27 : MePCE est une méthyltransférase conservée (d'après Jeronimo et al, 2007)

A) Représentation linéaire de MePCE avec ses domaine ARN méthylase et Bin3.

B) Conservation de la protéine MePCE au cours de l'évolution. Représentation schématique de la protéine MePCE humaine et de ses homologues. Les régions conservées contenant les motifs méthyltransférases sont indiquées.

interagit également avec le snARN U6 mais une diminution de la quantité de MePCE par ARNi ne semble pas affecter la stabilité du snARN U6 (Jeronimo et al., 2007).

Tout comme LARP7, MePCE est stablement associée au snARN 7SK. En effet, dans des cellules soumises à divers stress cellulaires, tels que les UV, l'actinomycine D ou encore le DRB, tous induisant le désassemblage de la snRNP 7SK, HEXIM et P-TEFb se dissocient efficacement de MePCE. En revanche, dans ces mêmes conditions, MePCE reste stablement associée à LARP7 et au snARN 7SK (Barboric et al., 2009; Xue et al., 2010).

Des protéines homologues à MePCE ont été identifiées chez des métazoaires, des plantes et des eucaryotes inférieurs (figure 27). La plus forte homologie entre MePCE et ses homologues est présente dans leur région carboxy-terminale, qui contient les motifs conservés ARN méthylase et Bin3 (Jeronimo et al., 2007). Or, le motif conservé Bin3 est essentiel pour l'assemblage de la snRNP 7SK « cœur » (Barboric et al., 2009).

MePCE faisant partie de la snRNP 7SK, elle interagit avec HEXIM, P-TEFb et LARP7. Or, l'interaction de MePCE avec HEXIM et P-TEFb semble principalement dépendante du snARN 7SK, alors que son interaction avec LARP7 est indépendante du snARN 7SK. En effet, un traitement à la RNase A abolit l'interaction de MePCE avec HEXIM et P-TEFb (Barboric et al., 2009; Xue et al., 2010). Malgré tout, même si le complexe LARP7-MePCE déjà assemblé au sein de la snRNP 7SK « cœur » est stable, l'assemblage de ce complexe est médié par le snARN 7SK. En effet, le traitement à la RNase d'extraits obtenus à partir de cellules exprimant stablement une version étiquetée de MePCE, avant leur incubation avec une protéine LARP7 recombinante, abolit l'interaction entre ces deux protéines (Barboric et al., 2009).

Par ailleurs, le snARN 7SK est coiffé par la protéine MePCE non associée à LARP7, probablement de façon co-transcriptionnelle, avant sa séquestration au sein de la snRNP 7SK. En effet, le snARN 7SK associé au sein de la snRNP 7SK contenant P-TEFb semble être déjà coiffé (Xue et al., 2010). De plus, en interagissant avec LARP7 au sein de la snRNP 7SK, MePCE perd son activité d'ajout de la coiffe, probablement à cause de l'occlusion de son site catalytique par LARP7 (Xue et al., 2010). Or, MePCE est la méthyltransférase prédominante, sinon la seule, impliquée dans l'ajout de la coiffe au snARN 7SK *in vivo* (Xue et al., 2010). Il semble que l'ajout de la coiffe au snARN 7SK soit entièrement réalisé par les protéines MePCE non associées à LARP7, qui représentent environ 50% des protéines MePCE cellulaires (Xue et al., 2010). Quant aux protéines MePCE associées au sein des snRNP 7SK, malgré leur absence d'activité catalytique, elles stimulent la liaison de LARP7 au snARN 7SK et coopèrent avec LARP7 pour permettre la formation de la snRNP 7SK « cœur » (Xue et al., 2010).

II) Les différentes RNP 7SK

Comme nous l'avons vu, dans des cellules en phase exponentielle de croissance, environ 50% des complexes P-TEFb nucléaires sont séquestrés au sein de la snRNP 7SK. Toutefois, le snARN 7SK est un ARN non codant très abondant, avec environ $2 \cdot 10^5$ molécules par cellule. Ainsi, seulement 30% à 50% des molécules de snARN 7SK nucléaires sont associées au sein des snRNP 7SK/HEXIM/P-TEFb (Barrandon et al., 2007; Yik et al., 2003). Cela suggère que la majeure partie des molécules de snARN 7SK interagit avec d'autres protéines au sein d'autres snRNP. Aussi, au cours des cinq dernières années, plusieurs nouveaux partenaires du snARN 7SK ont été identifiés, impliquant cet ARN dans de nouvelles fonctions cellulaires. Il est possible que d'autres partenaires du snARN 7SK restent à découvrir étant donné l'abondance de ce snARN.

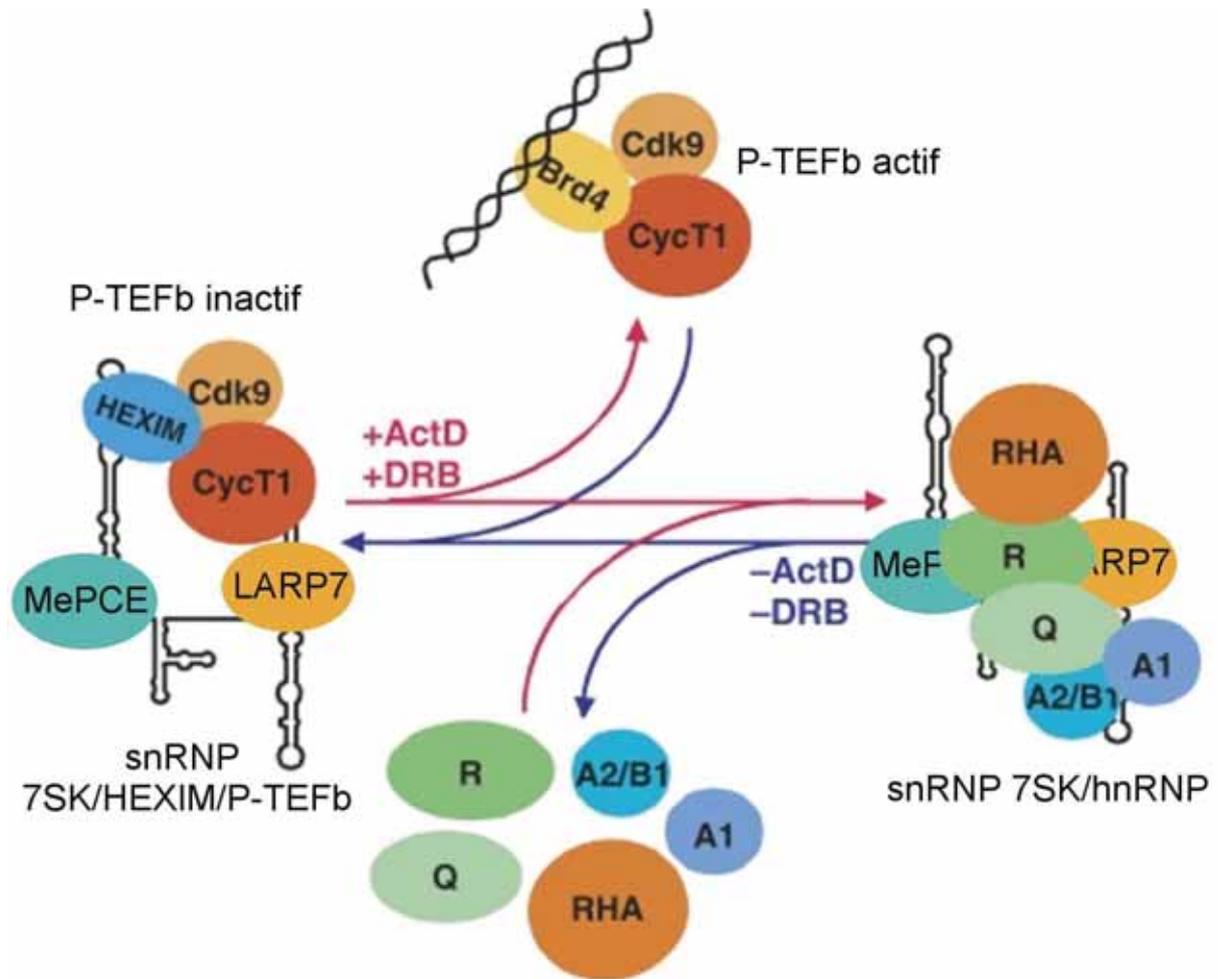


Figure 28 : Modèle de régulation du niveau de P-TEFb actif par le remodelage dynamique et réversible des snRNP 7SK (d'après Van Herreweghe et al, 2007)

Dans les cellules HeLa en phase de croissance exponentielle, environ 50% des complexes P-TEFb sont séquestrés au sein de la snRNP 7SK, tandis que l'autre moitié est associée à la protéine Brd4 qui recrute P-TEFb au niveau de nombreux gènes. L'inhibition de la transcription par un traitement à l'actinomycine D ou au DRB induit la dissociation de P-TEFb et HEXIM de la snRNP 7SK « cœur », constituée du snARN 7SK et des protéines LARP7 et MePCE. La protéine RHA et les hnRNP A1, A2/B1, R, Q et K (qui n'est pas représentée sur ce schéma) se lient alors à la snRNP 7SK « cœur ».

Parmi les nouveaux partenaires du snARN 7SK, les premiers à avoir été découverts sont les hnRNP A1, hnRNP A2 (Barrandon et al., 2007; Van Herreweghe et al., 2007), hnRNP R, hnRNP Q, (Barrandon et al., 2007; Hogg and Collins, 2007; Van Herreweghe et al., 2007), l'ARN hélicase A (Van Herreweghe et al., 2007), hnRNP K, hnRNP H, la protéine CSDA et une protéine nommée C9orf10/ossa (Hogg and Collins, 2007). Par la suite, deux autres protéines, HMGA1 (Eilebrecht et al., 2011a; Eilebrecht et al., 2011b; Eilebrecht et al., 2011c) et Ars2 (Gruber et al., 2012) ont été identifiées comme associées au snARN 7SK.

II-1) Les snRNP 7SK/hnRNP

Les protéines hnRNP A1, A2, R, Q, K et la protéine RHA s'associent au snARN 7SK dans des cellules en phase exponentielle de croissance. Les protéines hnRNP A1 et A2 se lient spécifiquement et exclusivement à la troisième tige-boucle du snARN 7SK, tandis que la liaison des protéines hnRNP Q et R nécessite des éléments situés et dans la première tige-boucle située à l'extrémité 5' et dans la troisième tige-boucle du snARN 7SK (Van Herreweghe et al., 2007). Il a été montré que seule une petite fraction des molécules de snARN 7SK s'associe à ces nouveaux partenaires. En effet, environ 5% des molécules de snARN 7SK s'associent à la hnRNP A1, et environ 1% s'associent aux hnRNP Q/R (Barrandon et al., 2007). Néanmoins, contrairement à P-TEFb et HEXIM, ces protéines ne se dissocient pas du snARN 7SK en conditions d'inhibition de la transcription (Barrandon et al., 2007; Hogg and Collins, 2007; Van Herreweghe et al., 2007). Au contraire, lorsque la snRNP 7SK/HEXIM/P-TEFb se désassemble, les niveaux de snRNP 7SK contenant les protéines RHA, hnRNP A1, A2/B1, R, Q et K augmentent (figure 28) (Barrandon et al., 2007; Hogg and Collins, 2007; Van Herreweghe et al., 2007). De façon importante, l'arrêt du traitement avec des agents induisant un stress transcriptionnel, entraîne un retour à la normale des niveaux de snRNP 7SK/HEXIM/P-TEFb et de snRNP 7SK/hnRNP (Barrandon et al., 2007; Van Herreweghe et al., 2007). Cela indique que les snRNP 7SK subissent des remodelages dynamiques et réversibles en réponse à une inhibition de la transcription. Il semble donc qu'il existe un équilibre fonctionnel dynamique entre les snRNP 7SK/HEXIM/P-TEFb et 7SK/hnRNP, finement régulé en fonction des besoins transcriptionnels de la cellule. Ainsi, l'inhibition de la transcription déplace cet équilibre vers la snRNP 7SK/hnRNP, entraînant une augmentation des niveaux de P-TEFb libre actif. Par ailleurs, la liaison des protéines hnRNP au snARN 7SK semble essentielle à la libération de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK (Barrandon et al., 2007; Van Herreweghe et al., 2007).

II-2) Les nouveaux partenaires du snARN 7SK

Récemment, il a été montré qu'une fraction des molécules de snARN 7SK est associée à HMGA1 (Eilebrecht et al., 2011c). Les protéines HMGA sont des facteurs de transcription qui régulent positivement et négativement la transcription de divers gènes. Ces facteurs de transcription n'ont pas la capacité d'activer la transcription de manière directe. Ils régulent l'expression des gènes en modifiant la conformation de l'ADN en se liant à des régions de l'ADN riches en A/T et/ou en interagissant directement avec divers facteurs de transcription. De cette façon, les protéines HMGA influencent un large éventail de processus biologiques incluant la croissance, la prolifération, la différenciation, et la mort cellulaire (Cleynen and Van de Ven, 2008). En entrant en compétition avec l'ADN double brin pour la liaison à HMGA1, le snARN 7SK régule négativement son activité. L'interaction du snARN 7SK avec HMGA1 est médiée par la deuxième tige-boucle de l'ARN qui n'est pas impliquée dans la formation de la snRNP 7SK/HEXIM/P-TEFb (Eilebrecht et al., 2011c). Ainsi, la surexpression dans des cellules en culture de la deuxième tige-boucle du snARN 7SK affecte

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE-

Chapitre III : Rôle des RNP 7SK dans la régulation de la transcription

l'expression de gènes régulés par HMGA1 mais n'affecte pas l'expression des gènes régulés par P-TEFb (Eilebrecht et al., 2011c). Néanmoins, il a été montré que HMGA1 et P-TEFb coopèrent pour activer la transcription de certains gènes cibles. Ainsi, l'existence de complexes contenant simultanément le snARN 7SK, P-TEFb et HMGA1 a été mise en évidence (Eilebrecht et al., 2011b). Ces études suggèrent donc un nouveau rôle pour le snARN 7SK dans la régulation de l'initiation de la transcription.

Par ailleurs, la surexpression de la deuxième tige-boucle du snARN 7SK affecte également l'expression d'un petit groupe de gènes non régulés par HMGA1 ou P-TEFb, suggérant que d'autres facteurs pourraient se lier à cette structure du snARN 7SK (Eilebrecht et al., 2011a).

Enfin, il a récemment été montré que la protéine Ars2 interagit avec le snARN 7SK. Comme pour les protéines hnRNP, cette interaction entre le snARN 7SK et Ars2 augmente lorsque la snRNP 7SK/HEXIM/P-TEFb est désassemblée par un traitement avec de faibles concentrations d'un inhibiteur de la transcription (Gruber et al., 2012). Ars2 est une protéine appartenant au complexe nucléaire de liaison à la coiffe (ou CBC pour Cap Binding Complex) qui se lie à la coiffe 7-méthylguanosine des ARN synthétisés par l'ARN pol II. Ars2 favorise la maturation de l'extrémité 3' des ARNm des histones réplication-dépendantes. Les CBC contenant Ars2 sont donc des contributeurs fondamentaux de la régulation du clivage de l'extrémité 3' des ARNm des histones réplication-dépendantes. Or, le snARN 7SK, en s'associant avec Ars2, régule négativement sa capacité à contribuer à la maturation de l'extrémité 3' des ARNm d'histones (Gruber et al., 2012). Cette étude suggère donc un nouveau rôle pour le snARN 7SK dans la régulation de la formation de l'extrémité 3' des ARNm des histones réplication-dépendantes.

Chapitre IV : Pathologies associées au facteur P-TEFb

médecine/sciences 2012 ; 28 : 200-5

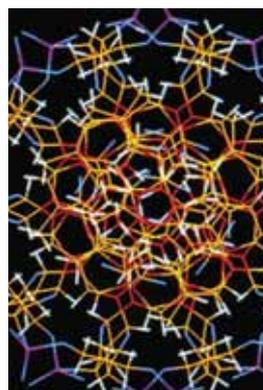


> Le facteur P-TEFb stimule l'élongation de la transcription par l'ARN pol II. Dans les cellules humaines, le taux de P-TEFb disponible pour activer la transcription est contrôlé par un ARN non codant, l'ARN 7SK. Cet ARN s'associe à une fraction de P-TEFb qu'il séquestre au sein d'un complexe inactif. Un équilibre dynamique entre les formes active et inactive de P-TEFb permet d'adapter sa disponibilité aux besoins transcriptionnels de la cellule. Des perturbations de cet équilibre sont associées au développement de certaines tumeurs et à l'hypertrophie cardiaque. Ce système de régulation est également ciblé par le VIH pour augmenter la fraction active de P-TEFb dans les cellules infectées. <

Le facteur positif d'élongation de la transcription, P-TEFb, est un hétérodimère composé d'une kinase, CDK9, et d'une cycline (T1 ou T2). L'activité kinase de P-TEFb fut initialement décrite comme essentielle à l'expression des gènes du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et de certains gènes cellulaires (*c-myc*, *c-fos*, *hsp70*). La transcription de ces gènes par l'ARN polymérase (pol) II est principalement contrôlée au cours de l'élongation. En effet, peu après l'initiation de la transcription, l'ARN pol II marque une pause transcriptionnelle, imposée par l'action simultanée de deux facteurs négatifs d'élongation (N-TEF), DSIF (*DRB sensitivity inducing factor*) et NELF (*negative elongation factor*) [1, 2]. Le recrutement de P-TEFb au niveau de la machinerie transcriptionnelle permet la phosphorylation par CDK9 du domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARN pol II sur la sérine 2 (Ser2), mais aussi celle des N-TEF (Figure 1). Ces événements de phosphorylation permettent la reprise de la transcription par l'ARN pol II et la synthèse d'ARNm pleine-taille. P-TEFb pourrait être recruté au niveau de la machinerie transcriptionnelle au sein d'un *super elongation complex* (ou SEC) qui contient un autre facteur d'élongation (la protéine ELL2) et des coactivateurs (les protéines AFF4, ENL et AF9) [3].

Perturbations de la transcription liées à une dérégulation de P-TEFb : cancer, Sida et hypertrophie cardiaque

Lisa Muniz, Tamàs Kiss, Sylvain Egloff



Université de Toulouse, université Paul Sabatier, CNRS laboratoire de biologie moléculaire des eucaryotes, 118, route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France. sylvain.egloff@ibcg.biotoul.fr

Plus récemment, des études réalisées à l'échelle du génome ont permis de mesurer l'étendue de ce phénomène. Ainsi, la pause transcriptionnelle de l'ARN pol II est détectée à proximité de nombreux promoteurs de gènes humains [2]. L'expression des gènes n'est donc pas seulement régulée au cours de l'initiation *via* le recrutement de l'ARN pol II au niveau du promoteur, elle est également contrôlée par la capacité de l'ARN pol II à entrer en phase d'élongation dite « productive ». L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de CDK9 a mis en évidence le rôle central de P-TEFb dans ce mécanisme. Dans le contexte cellulaire, l'activité de CDK9 doit donc être finement contrôlée. En 2001, deux études indépendantes ont mis en évidence un système particulier de régulation de l'activité de P-TEFb [5]. Un petit ARN non codant, l'ARN 7SK, s'associe à P-TEFb pour moduler son activité kinase. Cet ARN est l'un des premiers exemples d'ARN non codant capable de moduler la transcription par l'ARN pol II [6].

Contrôle de l'activité de P-TEFb par la RNP 7SK/HEXIM

L'ARN 7SK est un petit ARN nucléaire de 331 nucléotides, conservé chez les métazoaires [6]. Deux protéines, MePCE (*methylphosphate capping enzyme*) et LARP7 (*La related protein, member 7*), s'associent à l'ARN 7SK pour protéger ses extrémités, formant ainsi la ribonucléoparticule (RNP) 7SK « cœur ». MePCE (également appelée BCDIN3) ajoute la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN, alors que LARP7 (également appelée PIP7S) est une protéine de type La qui lie la région 3' de 7SK [6-9]. Cette RNP « cœur » joue un rôle de plateforme structurale permettant la liaison d'autres protéines. La protéine HEXIM1 (et/ou HEXIM2- *hexamethylene bis-acetamide inducible 1 ou 2*) s'associe sous forme de dimère à une

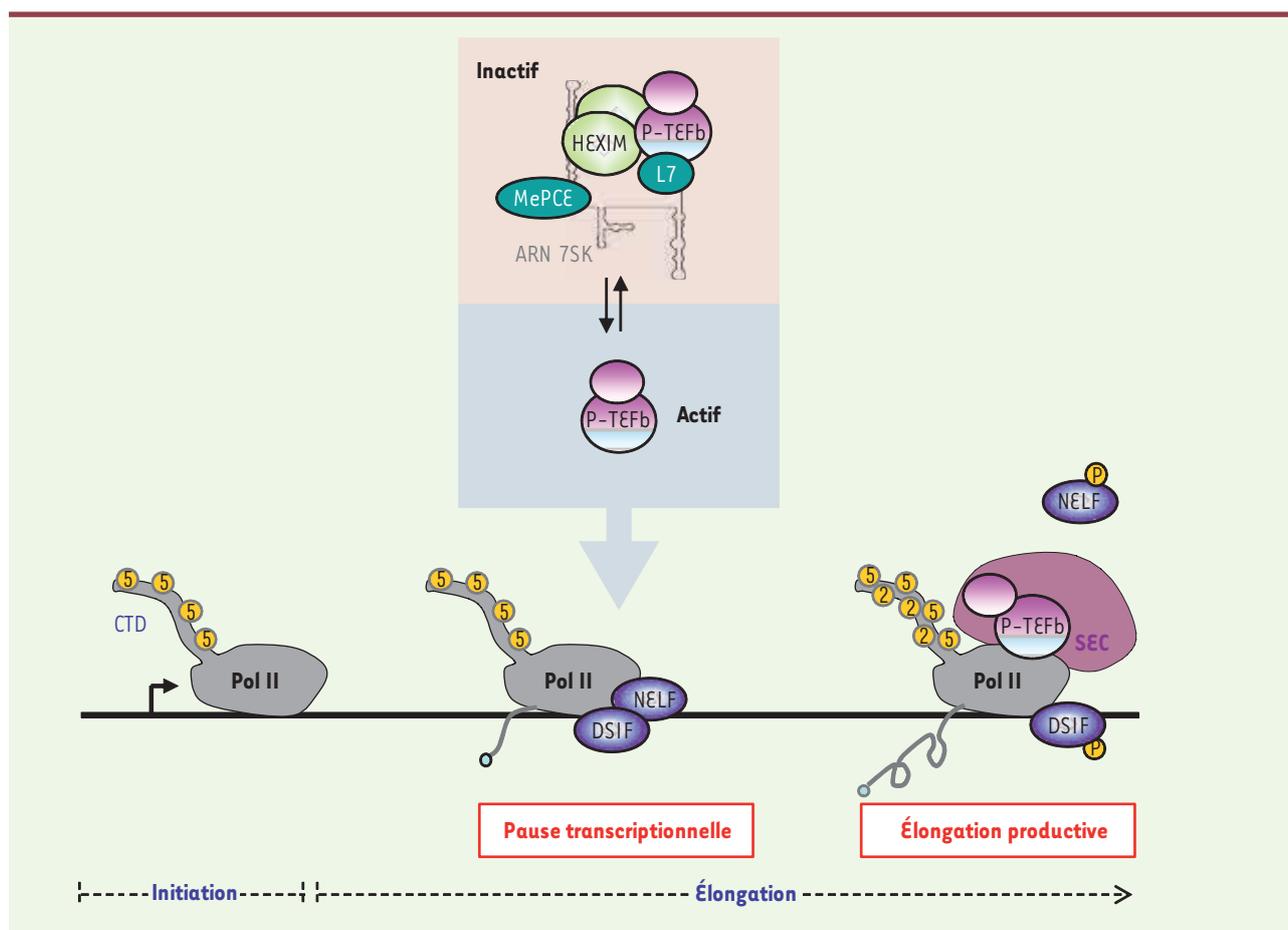


Figure 1. Contrôle de l'activité de P-TEFb et élongation de la transcription. P-TEFb existe sous deux formes en équilibre dynamique dans les cellules humaines. Une fraction de P-TEFb est inactivée par l'ARN 7SK et l'autre fraction est sous forme libre et active. La forme active est recrutée au niveau de l'ARN pol II au sein du *super elongation complex* (SEC) pour lever la pause transcriptionnelle imposée par les facteurs négatifs d'élongation DSIF et NELF. La phosphorylation par P-TEFb du CTD de l'ARN pol II et des N-TEF permet la transition vers une élongation productive (voir texte pour plus de détails).

structure en tige/boucle située à l'extrémité 5' de l'ARN 7SK [10]. La liaison à l'ARN 7SK entraîne un changement conformationnel des protéines HEXIM leur permettant d'interagir avec la cycline T1 [11]. P-TEFb se retrouve alors séquestré dans un complexe ribonucléoprotéique au sein duquel l'activité kinase de CDK9 est inhibée. Dans les cellules HeLa, environ 50 % de P-TEFb est maintenu sous forme inactive, associé à la RNP 7SK/HEXIM [4]. Deux populations de P-TEFb coexistent donc dans la cellule : la forme libre et active capable de stimuler la transcription, et la forme inactive séquestrée par l'ARN 7SK (Figure 1). La forme libre de P-TEFb est recrutée au niveau des gènes transcrits par divers facteurs de transcription tels que Brd4, NF- κ B, c-Myc ou MyoD [1].

L'association d'HEXIM et de P-TEFb à la RNP 7SK « cœur » est dynamique et réversible, et peut être modulée par les conditions environnementales [4, 5]. Par exemple, l'inhibition de la transcription induit la dissociation du complexe P-TEFb/7SK/HEXIM, permettant une rapide augmentation de la quantité de molécules P-TEFb actives et disponibles pour la transcription par l'ARN pol II. Pour empêcher sa réassociation avec HEXIM et P-TEFb, l'ARN 7SK libéré est, quant à lui, titré par des protéines de type hnRNP (*heterogeneous nuclear*

ribonucleoproteins) [12, 13]. Ce mécanisme de régulation consiste donc à moduler la quantité de P-TEFb disponible pour activer la transcription. La forme inactive peut ainsi être considérée comme un réservoir cellulaire de P-TEFb, mobilisable à tout moment par la cellule.

L'équilibre dynamique entre les formes active et inactive de P-TEFb permet d'adapter finement le taux de P-TEFb disponible en fonction des besoins transcriptionnels de la cellule. Tout dysfonctionnement ou stimulus capable de modifier cet équilibre peut profondément perturber l'activité physiologique de la cellule. La dérégulation de l'activité de P-TEFb peut, en effet, conduire à d'importantes modifications de l'expression génique, et être à l'origine de pathologies graves. La RNP 7SK « cœur » et les protéines HEXIM ont d'ailleurs un rôle désormais bien établi dans des pathologies telles que l'hypertrophie cardiaque, le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ou certains cancers, ce qui souligne l'importance de ce système de régulation de l'activité de P-TEFb.

Dérégulation de l'activité de P-TEFb et hypertrophie cardiaque

L'hypertrophie cardiaque se caractérise par un élargissement global de la taille des cardiomyocytes à la suite d'une augmentation des taux d'ARN et de protéines cellulaires. Cette réponse représente normalement une adaptation physiologique à un travail accru du cœur, mais expose, lorsqu'elle persiste, à un risque élevé de défaillance cardiaque. Les études qui portent sur les mécanismes moléculaires à l'origine de la maladie chez l'homme soulignent l'importance de la régulation de l'activité de P-TEFb par la RNP 7SK/HEXIM dans les cardiomyocytes [14]. Divers signaux hypertrophiques, certains facteurs de croissance ou un stress mécanique sévère, activent des voies de signalisation qui influencent directement l'équilibre entre les formes active et inactive de P-TEFb. Ces signaux hypertrophiques induisent la dissociation du complexe inactif, augmentant le taux de P-TEFb actif dans des cellules où l'activité de CDK9 est normalement limitante. L'activation de P-TEFb stimule alors la transcription par l'ARN pol II, entraînant l'augmentation du taux d'ARNm et de protéines cellulaires. En accord avec une stimulation de l'élongation de la transcription, le niveau de phosphorylation du CTD, et notamment celui de la Ser2, augmente dans les conditions de stress hypertrophique.

Le contrôle de la disponibilité de P-TEFb est donc un mécanisme essentiel pour la fonction et le développement des cardiomyocytes. Chez la souris, l'activation aberrante de P-TEFb engendre, comme chez l'homme, des manifestations d'hypertrophie cardiaque. Par exemple, la délétion génétique de CLP-1, l'homologue murin d'HEXIM1, entraîne une létalité embryonnaire qu'explique un élargissement pathologique du cœur mimant les caractéristiques de l'hypertrophie cardiaque [15]. De la même façon, l'inactivation de l'ARN 7SK par ARN interférence dans les cardiomyocytes induit une activation de CDK9, suffisante pour induire une croissance anormale de ces cellules. Au-delà de l'élargissement des cellules, l'activation constitutive de CDK9 aboutit également à un dysfonctionnement des mitochondries [14] qui entraîne l'apoptose des myocytes et prédispose à la défaillance cardiaque.

Dans les cardiomyocytes, la régulation de P-TEFb par la RNP 7SK/HEXIM permet de limiter l'activité de CDK9. Les signaux hypertrophiques perturbent l'équilibre entre forme active et inactive de P-TEFb et font de l'hypertrophie cardiaque un modèle physiopathologique idéal pour étudier le système de régulation de P-TEFb. L'étude approfondie des cascades de signalisation activées par les signaux hypertrophiques, et notamment celles qui sont dépendantes du calcium (calcineurine) et JAK/STAT [14], pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui régissent la séquestration de P-TEFb par la RNP 7SK/HEXIM.

Le système de régulation de P-TEFb, cible du VIH-1

Comme tous les rétrovirus, le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) intègre son génome dans celui de la cellule infectée afin de se répliquer. L'expression des gènes viraux est alors contrôlée par la machinerie transcriptionnelle de la cellule hôte. La transcription basale à partir du promoteur LTR (*long terminal repeat*) du VIH

est inefficace, car la progression de l'ARN pol II sur le génome viral est bloquée par les N-TEF peu après l'initiation. La transcription est activée par une protéine virale appelée Tat, qui facilite le passage vers une élongation productive [16]. Pour cela, Tat recrute P-TEFb au niveau de l'ARN pol II bloquée en formant un complexe stable avec la cycline T1 et une structure en tige/boucle appelée TAR (*trans-acting response element*), formée à l'extrémité 5' de l'ARNm viral naissant [17]. P-TEFb peut ensuite stimuler la reprise de la transcription et la production de transcrits pleine-taille. Il a récemment été montré que le complexe P-TEFb recruté au niveau de l'ARN TAR est associé aux autres protéines du *super elongation complex* (SEC) [3, 18-20]. L'association de Tat avec le SEC permet donc le recrutement simultané de plusieurs facteurs d'élongation au niveau du promoteur viral.

L'activité kinase de CDK9 est essentielle et limitante pour la transcription des gènes viraux, qui semble plus sensible à la disponibilité de P-TEFb que les promoteurs cellulaires [21]. Ainsi, tous les inhibiteurs de P-TEFb identifiés à ce jour inhibent efficacement la réplication du virus. Un taux restreint de P-TEFb actif, associé à la mise en place d'une structure chromatinienne restrictive au niveau du promoteur LTR, semble être à l'origine de l'établissement de la latence du virus dans les cellules T CD4⁺ primaires [22].

Dans les cellules dans lesquelles le VIH se réplique, l'équilibre entre les formes active et inactive de P-TEFb est modifié. En effet, la protéine Tat, même en l'absence d'autres protéines et ARN viraux, est capable de libérer la fraction de P-TEFb séquestrée dans la RNP 7SK/HEXIM, entraînant ainsi une augmentation significative du taux de P-TEFb libre dans la cellule [23, 24]. Comment le VIH, via la protéine Tat, détourne-t-il le système de régulation de P-TEFb endogène ? Deux cibles principales de Tat ont été identifiées : l'ARN 7SK et la cycline T1. Tat se lie à l'ARN 7SK au niveau du site de liaison d'HEXIM [25], créant une compétition entre ces deux protéines pour la liaison à l'ARN 7SK [24, 25]. La détection d'un complexe contenant Tat, l'ARN 7SK, P-TEFb mais pas HEXIM, suggère que Tat peut, au moins transitoirement, remplacer HEXIM au sein de la RNP 7SK/P-TEFb (Figure 2) [20]. De plus, Tat interagit directement avec la cycline T1 et entre en compétition avec HEXIM pour la liaison à P-TEFb [20, 23]. La plus forte affinité de Tat pour la cycline T1 bloque l'interaction entre HEXIM1 et P-TEFb [15, 23], empêchant ainsi la séquestration de P-TEFb au sein de la RNP 7SK/HEXIM. Une autre étude suggère que Tat s'associe également avec la forme inactive de P-TEFb. Ce complexe est alors recruté au promoteur du VIH avant l'initiation de la transcription, via son association avec le complexe de

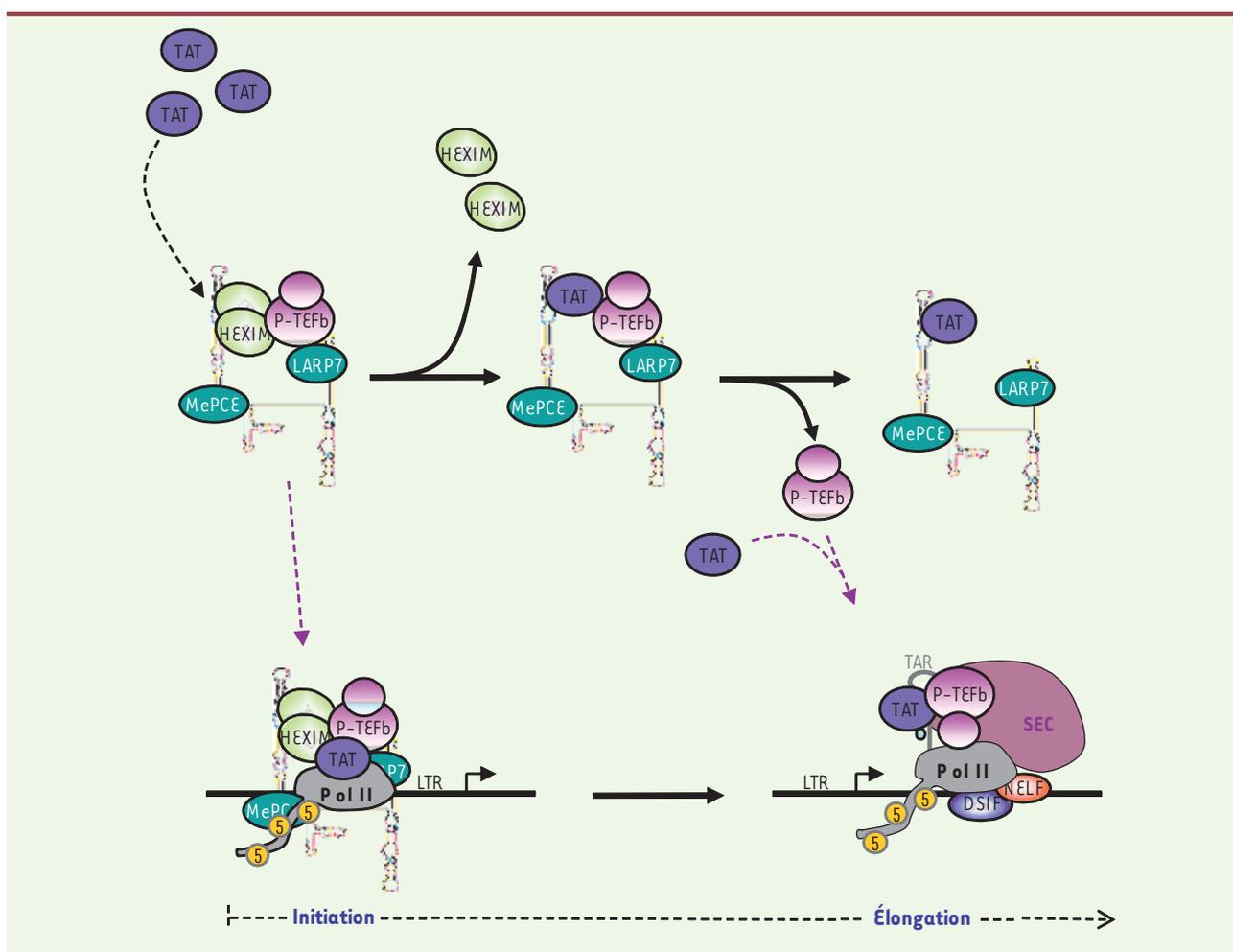


Figure 2. Libération de la fraction inactive de P-TEFb par la protéine virale Tat. Tat lie l'ARN 7SK au niveau du site de liaison d'HEXIM1 et remplace HEXIM1 au sein d'un complexe contenant P-TEFb et la RNP 7SK « cœur ». Après relargage de P-TEFb, une autre protéine Tat s'associe à la cycline T1 et recrute P-TEFb au niveau des gènes viraux, via la liaison à l'ARN TAR. Au sein du SEC, P-TEFb active la transcription du génome viral. La forme inactive de P-TEFb peut également être recrutée par Tat directement au niveau du promoteur LTR.

pré-initiation, de manière indépendante de l'ARN TAR (Figure 2). Après l'initiation, l'ARN TAR naissant permettrait la dissociation de la RNP 7SK/HEXIM [26]. Le site de liaison de Tat à l'ARN TAR étant structurellement identique à celui présent dans l'ARN 7SK [25], une compétition entre les deux ARN pour la liaison de Tat pourrait donc induire l'activation de P-TEFb. Malgré tout, le niveau de la RNP 7SK/HEXIM détecté sur le promoteur LTR est très faible et ne peut pas expliquer le taux élevé de P-TEFb observé lors de la transactivation par Tat. Il est par conséquent probable que les deux mécanismes qui recrutent P-TEFb fonctionnent en synergie pour activer la transcription des gènes viraux.

La protéine Tat joue donc un double rôle dans l'activation transcriptionnelle des gènes viraux. D'une part, elle recrute le SEC au niveau de la machinerie transcriptionnelle via l'ARN TAR. D'autre part, elle modifie le taux intracellulaire de P-TEFb actif en perturbant son système de régulation endogène, de façon à obtenir la concentration en P-TEFb nécessaire à la transcription de ses propres gènes.

P-TEFb et cancer

L'équilibre entre les formes active et inactive de P-TEFb est adapté à l'état de croissance et de différenciation de la cellule [1]. Une modification de cet équilibre peut engendrer d'importantes perturbations de l'expression génique, pouvant entraîner une prolifération non contrôlée des cellules. Ainsi, un niveau élevé de P-TEFb a été mis en évidence dans différents types de tumeurs [27]. Par ailleurs, une surexpression de la cycline T1 peut induire la transformation de cellules *in vitro* et une accélération du développement de tumeurs chez la souris, soulignant le rôle oncogénique de P-TEFb [27]. L'activation de P-TEFb peut également résulter d'une dérégulation ou d'une mutation affectant l'un des constituants de la RNP 7SK/HEXIM ou son intégrité. Une

diminution de l'expression d'HEXIM1 a ainsi été observée dans les cancers du sein par rapport aux niveaux observés dans des tissus mammaires sains [15]. En effet, dans les cellules mammaires, la surexpression d'HEXIM1 bloque le recrutement de P-TEFb et du récepteur aux œstrogènes α (RE α) sur le promoteur de ses gènes cibles, impliqués dans la prolifération cellulaire et l'apoptose. HEXIM1 inhibe donc l'expression de ces gènes, limitant ainsi la prolifération des cellules mammaires [28]. La présence d'HEXIM1 au niveau des promoteurs des gènes cibles du RE α est d'ailleurs un élément clé de la réponse au tamoxifène, un antagoniste du récepteur des œstrogènes utilisé dans le traitement des cancers du sein œstrogéno-dépendants [29].

La protéine LARP7, quant à elle, assure l'intégrité des RNP 7SK en stabilisant l'ARN 7SK. La déplétion de LARP7 entraîne celle de l'ARN 7SK, avec pour conséquence une augmentation du niveau de P-TEFb actif dans les cellules [7]. Chez l'homme, des mutations dans la partie carboxy-terminale de LARP7, identifiées dans des tumeurs gastriques, abolissent son interaction avec l'ARN 7SK et affectent l'intégrité de la RNP 7SK/HEXIM/P-TEFb [7]. De la même façon, la déplétion de LARP7 dans des cellules épithéliales mammaires en culture entraîne leur transformation, un processus qui requiert la hausse d'activité de P-TEFb [7]. La diminution de l'expression de LARP7 semble également être un bon marqueur prédictif de la présence de métastases ganglionnaires à un stade tumoral précoce [30]. L'activation de P-TEFb, qui résulte d'une déstabilisation de la RNP 7SK/HEXIM/P-TEFb, pourrait donc jouer un rôle important dans la prolifération et l'agressivité des cellules cancéreuses.

Par ailleurs, trois sous-unités du SEC ont été identifiées comme partenaires de translocation de la protéine MLL (*mixed lineage leukemia*) [31]. Ces protéines, lorsqu'elles sont fusionnées au domaine de liaison à l'ADN de MLL, recrutent le SEC au niveau des gènes cibles de MLL et modifient leur expression. Il peut en résulter une prolifération non contrôlée des progéniteurs hématopoiétiques et une transformation leucémique. La présence de P-TEFb au sein du SEC avec les partenaires de translocation de la protéine MLL est un argument en faveur de son implication dans le développement des leucémies infantiles. Ainsi, l'efficacité thérapeutique du flavopiridol, un composé antiprolifératif qui cible spécifiquement l'activité de CDK9 dans certaines leucémies, est actuellement testée dans des essais cliniques. Le contrôle du système de régulation endogène de P-TEFb pourrait donc représenter une solution alternative pour l'élaboration de nouvelles drogues anticancéreuses.

Conclusion

La découverte de la fonction cellulaire de l'ARN 7SK, en 2001, a constitué une avancée significative dans la compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant l'activité de P-TEFb dans les cellules humaines. Les recherches entreprises depuis 10 ans ont permis de mieux caractériser la RNP 7SK/HEXIM et son mode d'action.

Ainsi, certains stress, certaines protéines ou molécules qui modifient le taux de P-TEFb actif en perturbant son système de régulation par la RNP 7SK/HEXIM ont été identifiés (Figure 3). De nombreuses questions restent toutefois en suspens. Quels mécanismes régissent l'équilibre dynamique entre les formes active et inactive de P-TEFb ? Quelles cascades de signalisation libèrent P-TEFb de la RNP 7SK/HEXIM dans le cas de l'hypertrophie cardiaque ? Serait-il possible de bloquer ou limiter la réplication du VIH en empêchant la dissociation de la RNP 7SK/HEXIM/P-TEFb ? Quel rôle joue la RNP 7SK/HEXIM dans l'établissement de la latence du VIH ? Les études qui portent sur ces pathologies ont déjà contribué à la découverte de P-TEFb et de son système de régulation. Elles pourraient

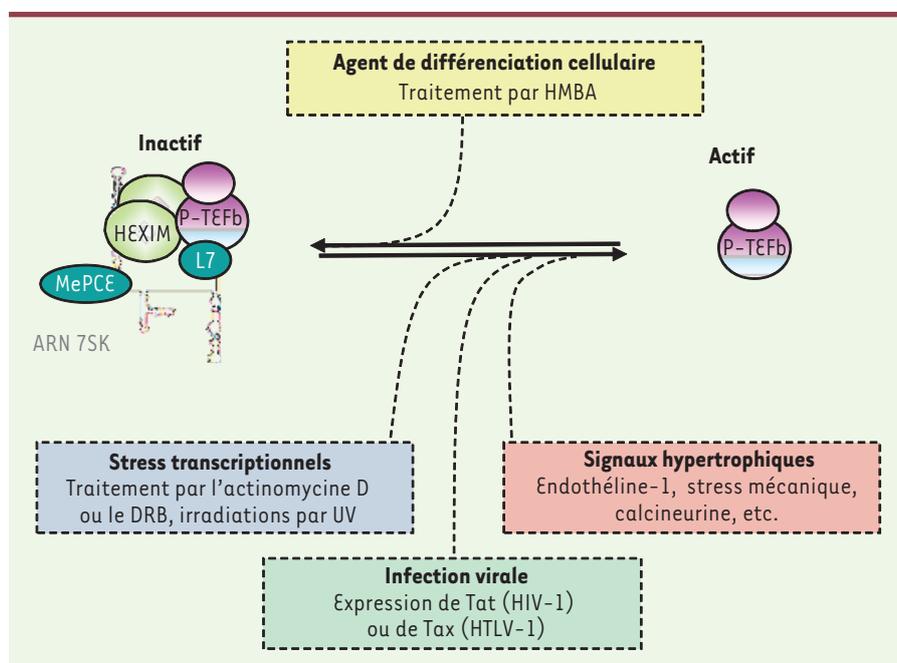


Figure 3. Équilibre dynamique entre les formes active et inactive de P-TEFb. Un stress transcriptionnel, l'infection par le VIH ou des signaux hypertrophiques peuvent induire la dissociation de la RNP 7SK/HEXIM et libérer la forme active de P-TEFb. L'équilibre peut également être déplacé vers la forme inactive lorsque l'on induit la différenciation cellulaire.

désormais ouvrir de nouvelles perspectives dans le développement d'approches thérapeutiques visant à cibler spécifiquement l'activité kinase de P-TEFb. \diamond

SUMMARY

Misregulation of P-TEFb activity: pathological consequences

P-TEFb stimulates transcription elongation by phosphorylating the carboxy-terminal domain of RNA pol II and antagonizing the effects of negative elongation factors. Its cellular availability is controlled by an abundant non coding RNA, conserved through evolution, the 7SK RNA. Together with the HEXIM proteins, 7SK RNA associates with and sequesters a fraction of cellular P-TEFb into a catalytically inactive complex. Active and inactive forms of P-TEFb are kept in a functional and dynamic equilibrium tightly linked to the transcriptional requirement of the cell. Importantly, cardiac hypertrophy and development of various types of human malignancies have been associated with increased P-TEFb activity, consequence of a disruption of this regulatory equilibrium. In addition, the HIV-1 Tat protein also releases P-TEFb from the 7SK/HEXIM complex during viral infection to promote viral transcription and replication. Here, we review the roles played by the 7SK RNP in cancer development, cardiac hypertrophy and AIDS. \diamond

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Zhou Q, Yik JH. The Yin and Yang of P-TEFb regulation: implications for human immunodeficiency virus gene expression and global control of cell growth and differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006 ; 70 : 646-59.
- Nechaev S, Adelman K. Pol II waiting in the starting gates: regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochim Biophys Acta* 2011 ; 1809 : 34-45.
- He N, Zhou Q. New insights into the control of HIV-1 transcription: when Tat meets the 7SK snRNP and super elongation complex (SEC). *J Neuroimmune Pharmacol* 2011 ; 6 : 260-8.
- Nguyen VT, Kiss T, Michels AA, Bensaude O. 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* 2001 ; 414 : 322-5.
- Yang Z, Zhu Q, Luo K, Zhou Q. The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature* 2001 ; 414 : 317-22.
- Diribarne G, Bensaude O. 7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor. *RNA Biol* 2009 ; 6 : 122-8.
- He N, Jahchan NS, Hong E, et al. A La-related protein modulates 7SK snRNP integrity to suppress P-TEFb-dependent transcriptional elongation and tumorigenesis. *Mol Cell* 2008 ; 29 : 588-99.
- Jeronimo C, Forget D, Bouchard A, et al. Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol Cell* 2007 ; 27 : 262-74.
- Xue Y, Yang Z, Chen R, Zhou Q. A capping-independent function of MePCE in stabilizing 7SK snRNA and facilitating the assembly of 7SK snRNP. *Nucleic Acids Res* 2010 ; 38 : 360-9.
- Egloff S, Van Herreweghe E, Kiss T. Regulation of polymerase II transcription by 7SK snRNA: two distinct RNA elements direct P-TEFb and HEXIM1 binding. *Mol Cell Biol* 2006 ; 26 : 630-42.
- Michels AA, Fraldi A, Li Q, et al. Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor. *Embo J* 2004 ; 23 : 2608-19.
- Barrandon C, Bonnet F, Nguyen VT, et al. The transcription-dependent dissociation of P-TEFb-HEXIM1-7SK RNA relies upon formation of hnRNP-7SK RNA complexes. *Mol Cell Biol* 2007 ; 27 : 6996-7006.
- Van Herreweghe E, Egloff S, Goiffon I, et al. Dynamic remodelling of human 7SK snRNP controls the nuclear level of active P-TEFb. *EMBO J* 2007 ; 26 : 3570-80.
- Sano M, Schneider MD. Cyclin-dependent kinase-9: an RNAPII kinase at the nexus of cardiac growth and death cascades. *Circ Res* 2004 ; 95 : 867-76.
- Dey A, Chao SH, Lane DP. HEXIM1 and the control of transcription elongation: from cancer and inflammation to AIDS and cardiac hypertrophy. *Cell Cycle* 2007 ; 6 : 1856-63.
- Cherrier T, Le Douce V, Redel L, et al. Un virus tapi dans l'ombre : les bases moléculaires de la latence du VIH-1. Partie II : la réactivation de la latence du VIH-1 et ses implications thérapeutiques. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 291-5.
- Wang Y, Liu XY, De Clercq E. Role of the HIV-1 positive elongation factor P-TEFb and inhibitors thereof. *Mini Rev Med Chem* 2009 ; 9 : 379-85.
- He N, Liu M, Hsu J, et al. HIV-1 Tat and host AFF4 recruit two transcription elongation factors into a bifunctional complex for coordinated activation of HIV-1 transcription. *Mol Cell* 2010 ; 38 : 428-38.
- Lin C, Smith ER, Takahashi H, et al. AFF4, a component of the ELL/P-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras, can link transcription elongation to leukemia. *Mol Cell* 2010 ; 37 : 429-37.
- Sobhian B, Laguette N, Yatim A, et al. HIV-1 Tat assembles a multifunctional transcription elongation complex and stably associates with the 7SK snRNP. *Mol Cell* 2010 ; 38 : 439-51.
- Flores O, Lee G, Kessler J, et al. Host-cell positive transcription elongation factor b kinase activity is essential and limiting for HIV type 1 replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 7208-13.
- Tyagi M, Pearson RJ, Karn J. Establishment of HIV latency in primary CD4+ cells is due to epigenetic transcriptional silencing and P-TEFb restriction. *J Virol* 2010 ; 84 : 6425-37.
- Barboric M, Yik JH, Czudnochowski N, et al. Tat competes with HEXIM1 to increase the active pool of P-TEFb for HIV-1 transcription. *Nucleic Acids Res* 2007 ; 35 : 2003-12.
- Sedore SC, Byers SA, Biglione S, et al. Manipulation of P-TEFb control machinery by HIV: recruitment of P-TEFb from the large form by Tat and binding of HEXIM1 to TAR. *Nucleic Acids Res* 2007 ; 35 : 4347-58.
- Muniz L, Egloff S, Ughy B, et al. Controlling cellular P-TEFb activity by the HIV-1 transcriptional transactivator Tat. *PLoS Pathog* 2010 ; 6 : e1001152.
- D'Orso I, Frankel AD. RNA-mediated displacement of an inhibitory snRNP complex activates transcription elongation. *Nat Struct Mol Biol* 2010 ; 17 : 815-21.
- Moiola C, De Luca P, Gardner K, et al. Cyclin T1 overexpression induces malignant transformation and tumor growth. *Cell Cycle* 2010 ; 9 : 3119-26.
- Ogba N, Chaplin LJ, Doughman YQ, et al. HEXIM1 regulates 17beta-estradiol/estrogen receptor-alpha-mediated expression of cyclin D1 in mammary cells via modulation of P-TEFb. *Cancer Res* 2008 ; 68 : 7015-24.
- Ketchart W, Ogba N, Kresak A, et al. HEXIM1 is a critical determinant of the response to tamoxifen. *Oncogene* 2011 ; 30 : 3563-9.
- Biewenga P, Buist MR, Moerland PD, et al. Gene expression in early stage cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008 ; 108 : 520-6.
- Smith E, Lin C, Shilatfard A. The super elongation complex (SEC) and MLL in development and disease. *Genes Dev* 2011 ; 25 : 661-72.

TIRÉS À PART

S. Egloff



Tarifs d'abonnement m/s - 2012

Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement
page 222 dans ce numéro de m/s



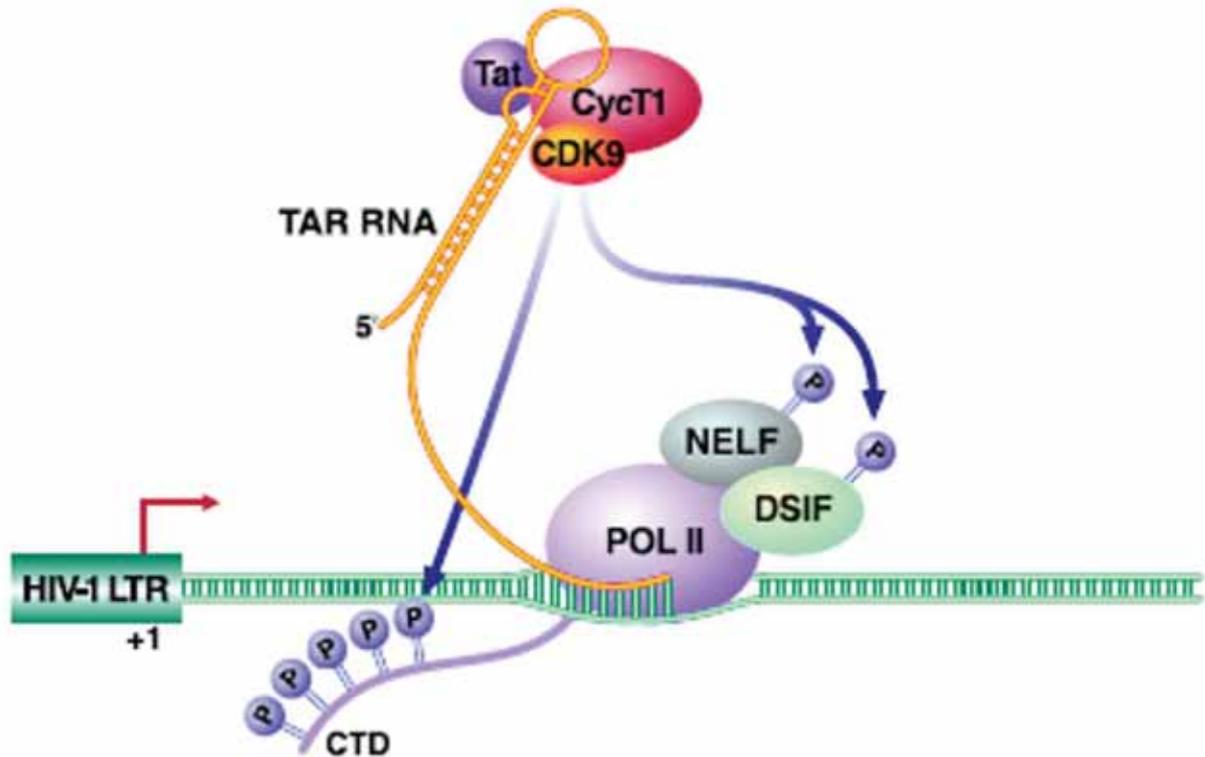


Figure 29 : Recrutement de P-TEFb par la protéine Tat du VIH-1 (tiré de Ott et al, 2011)

La protéine Tat du VIH-1 recrute le complexe P-TEFb constitué de la kinase CDK9 et de la CycT1 au niveau de l'ARN TAR, une structure en tige-boucle formée à l'extrémité 5' du transcrit viral naissant. P-TEFb active alors l'élongation de la transcription du génome viral en phosphorylant le CTD de l'ARN pol II ainsi que les facteurs négatifs d'élongation de la transcription DSIF et NELF.

Chapitre V : La transcription du génome du VIH-1

Comme nous l'avons vu, P-TEFb est un facteur de transcription général dont l'activité est essentielle pour une transcription efficace de nombreux gènes par l'ARN pol II. Or, en plus de son implication dans la transcription de nombreux gènes cellulaires, P-TEFb est également un facteur essentiel pour la transcription du génome du Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1).

Le VIH-1, qui est un virus de la famille des rétrovirus et du genre lentivirus, infecte les lymphocytes T CD4+ et les macrophages humains. Ce virus cause le Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA), un état dans lequel un affaiblissement progressif du système immunitaire entraîne le développement d'infections opportunistes et de cancers. Comme tous les rétrovirus, le VIH-1 possède un génome ARN qui est reverse-transcrit en ADN et s'intègre ensuite au génome de la cellule hôte. Le cycle biologique du virus se poursuit par la transcription du provirus intégré, étape qui reconstitue tant l'ARN génomique viral, que les ARNm dirigeant la synthèse des protéines virales. Le provirus intégré fonctionne comme un gène de la cellule hôte et est transcrit par l'ARN pol II cellulaire. Aussi, comme pour de nombreux gènes cellulaires transcrits par l'ARN pol II, la transcription du génome proviral intégré est régulée principalement à l'étape d'élongation. En effet, la transcription basale des gènes du VIH-1 est très inefficace, avec la majorité des événements d'initiation de la transcription par l'ARN pol II se terminant en élongation abortive (Marciniak and Sharp, 1991). Or, la transcription du provirus est cruciale pour la réplication du VIH-1.

Aussi, la protéine Tat (pour Transactivator of Transcription), codée par le génome du VIH-1, stimule la transition d'une élongation abortive vers une élongation productive. En l'absence de Tat, il a été montré que l'ARN pol II initie efficacement la transcription à partir du promoteur LTR (pour Long Terminal Repeat) du VIH-1 mais, entre ensuite rapidement en pause, ne produisant que de courts transcrits viraux. Tat stimule l'élongation de la transcription du provirus en recrutant le complexe P-TEFb au niveau de l'élément de réponse à la transactivation, l'ARN TAR, une structure en tige-boucle très conservée qui se forme spontanément à l'extrémité 5' de tous les ARN viraux naissants (des nucléotides +1 à +59). Tat se lie directement à la CycT1 du complexe P-TEFb humain, qui, contrairement aux CycT2a et T2b, contient un motif de reconnaissance de TAR important pour la formation du complexe ternaire Tat/TAR/P-TEFb (Wei et al., 1998; Wimmer et al., 1999). L'interaction de Tat avec la CycT1 induit la liaison coopérative du complexe P-TEFb sur l'ARN TAR (Garber et al., 1998a; Wei et al., 1998). De plus, la CycT1 remodèle la structure de Tat pour augmenter son affinité pour l'ARN TAR et, ce dernier renforce l'interaction entre Tat et la CycT1 (Zhang et al., 2000). L'ARN TAR sert donc d'échafaudage pour l'assemblage du complexe stable Tat/TAR/P-TEFb qui requiert des interactions coopératives entre ses différents constituants (Richter et al., 2002). Le recrutement des complexes P-TEFb au niveau de l'ARN TAR positionne CDK9 à proximité de l'ARN pol II en pause. CDK9 peut alors phosphoryler ses cibles, la Ser2 du CTD de l'ARN pol II, NELF et DSIF (figure 29). L'ARN pol II libérée de cette pause transcriptionnelle entre en élongation productive et synthétise des transcrits viraux pleine taille, requis pour une réplication virale productive (Peterlin and Price, 2006). Après l'identification de P-TEFb comme co-facteur de Tat, la question de l'existence d'autres facteurs délivrés par Tat au niveau du promoteur LTR du VIH-1 pour activer la transcription est longtemps restée sans réponse. Néanmoins, il est aujourd'hui établi que Tat recrute le SEC (voir chapitre III) au niveau du promoteur LTR du VIH-1 en interagissant avec TAR, permettant ainsi aux facteurs P-TEFb et ELL d'agir sur la même ARN pol II et

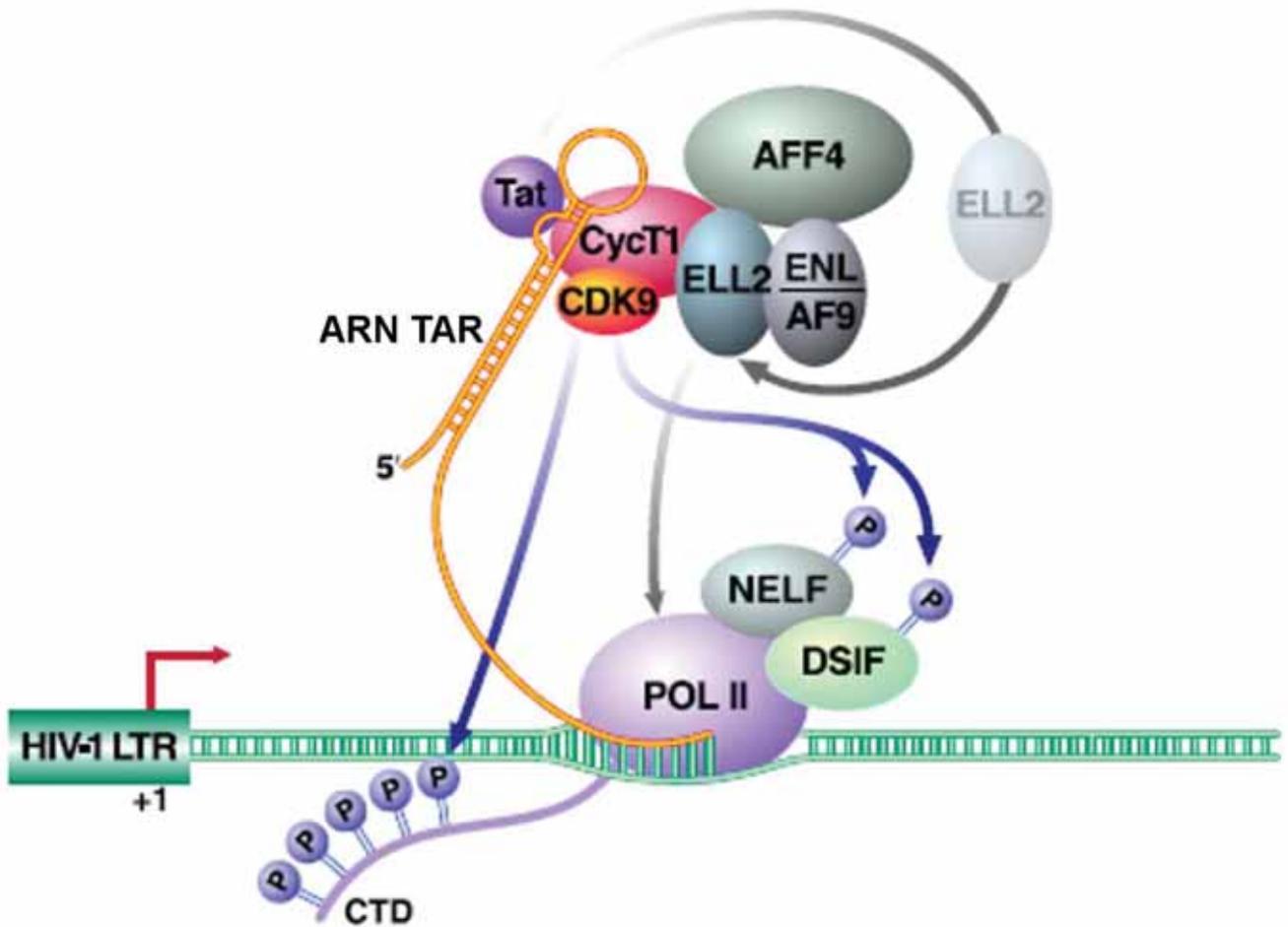


Figure 30 : Recrutement du SEC par P-TEFb (tiré de Ott et al, 2011)

La protéine Tat du VIH-1 recrute le SEC (Super Elongation Complex), un complexe contenant notamment P-TEFb et ELL, deux facteurs d'élongation, au niveau de l'ARN TAR. Tandis que P-TEFb phosphoryle ses substrats, ELL stimule la vitesse catalytique de l'ARN pol II, résultant en une activation synergique de l'élongation de la transcription du génome du VIH-1. Tat stabilise ELL et favorise ainsi la formation du SEC.

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -

Chapitre V : La transcription du génome du VIH-1

d'activer en synergie la transcription (He et al., 2010; Sobhian et al., 2010). De plus, Tat favorise la formation du SEC en stabilisant le facteur ELL (figure 30) (He et al., 2010).

Malgré sa petite taille (8 à 11 kDa), la protéine Tat contient plusieurs régions fonctionnelles cruciales, conservées au cours de l'évolution entre les lentivirus (figure 31). Une séquence variable de 20 à 50 acides aminés à l'extrémité amino-terminale de Tat précède un segment caractéristique de seize acides aminés riche en cystéines qui contient jusqu'à sept cystéines et une histidine (acides aminés 22 à 37 de la protéine Tat du VIH-1). Du côté carboxy-terminal du segment riche en cystéines, se trouve la région « cœur », qui présente le plus fort degré de conservation entre les différentes protéines Tat. La région riche en cystéines et la région « cœur » amino-terminales forment le domaine de transactivation, qui est principalement impliqué dans la liaison à la CycT1 du complexe P-TEFb. Le motif riche en arginine voisin (ARM, acides aminés 49 à 57 de la protéine Tat du VIH-1) est essentiel pour réguler la liaison à l'ARN TAR, la localisation nucléaire de Tat et sa stabilité (Barboric and Peterlin, 2005).

Des éléments spécifiques de l'ARN TAR sont nécessaires pour la formation du complexe Tat/TAR/P-TEFb. Au sein de l'ARN TAR du VIH-1, les nucléotides +19 à +43 constituent l'élément de réponse minimal nécessaire et suffisant pour la liaison de Tat. Cet élément forme une structure en tige-boucle avec, au sein de la tige, à quatre paires de nucléotides de la boucle apicale, une boucle latérale (ou bulge) riche en pyrimidines constituée de trois nucléotides (UCU). La boucle latérale UCU de l'ARN TAR est essentielle pour la liaison de la protéine Tat, tandis que la boucle apicale constituée de six nucléotides est essentielle pour la liaison de la CycT1 du complexe P-TEFb (figure 32). La composition de la boucle latérale et des paires de nucléotides formant le double brin d'ARN varient substantiellement entre les différentes espèces de lentivirus. Néanmoins, les protéines Tat des différentes espèces de lentivirus ont co-évolué avec leur élément TAR respectif (Anand et al., 2008).

L'expression des gènes du VIH-1 se produit en deux phases. Après l'intégration du provirus au sein du génome de la cellule hôte, la transcription basale à partir du promoteur LTR, qui est très inefficace, doit dans un premier temps entraîner la synthèse d'une quantité faible d'ARNm pleine taille pour permettre la production de la protéine Tat. Pour ce premier cycle de transcription, qui se fait donc en l'absence de Tat, un autre facteur doit recruter le complexe P-TEFb. Or, comme nous l'avons vu dans le chapitre III, un groupe de facteurs généraux ou gène-spécifiques ont été identifiés comme interagissant avec P-TEFb et pourraient être impliqués dans son recrutement. Parmi ces facteurs, il semble que pour le premier cycle de transcription du génome proviral intégré, plusieurs d'entre eux puissent être impliqués dans le recrutement de P-TEFb. En effet, la région LTR du VIH-1 contient notamment trois répétitions en tandem du site de liaison pour le facteur de transcription Sp1 et deux sites de liaison pour NF κ B. Sp1 et NF κ B ont tout d'abord été identifiés comme des facteurs impliqués dans l'initiation de la transcription à partir du LTR du VIH-1. En effet, Sp1 est un activateur transcriptionnel qui stimule le recrutement de la protéine TBP, une sous-unité de TFIID, à la boîte TATA (Gill et al., 1994), favorisant ainsi l'assemblage du PIC. Quant à NF- κ B, il favorise le recrutement d'histones acétyltransférases au niveau du promoteur, ce qui entraîne une modification de la structure du nucléosome localisé à proximité du promoteur (Gerritsen et al., 1997; Sheridan et al., 1997; Van Lint et al., 1996). Néanmoins, NF- κ B et Sp1 sont également impliqués dans le contrôle du passage de l'ARN pol II en élongation productive (West et al., 2001; Yedavalli et al., 2003). En effet, NF- κ B se lie à la sous-unité CycT1 du complexe P-TEFb, recrutant ainsi le complexe P-TEFb au niveau du promoteur LTR du VIH-1 (Barboric et al., 2001; Taube et al., 2002). P-TEFb pourrait également être recruté dans les complexes de pré-initiation à travers une association directe de

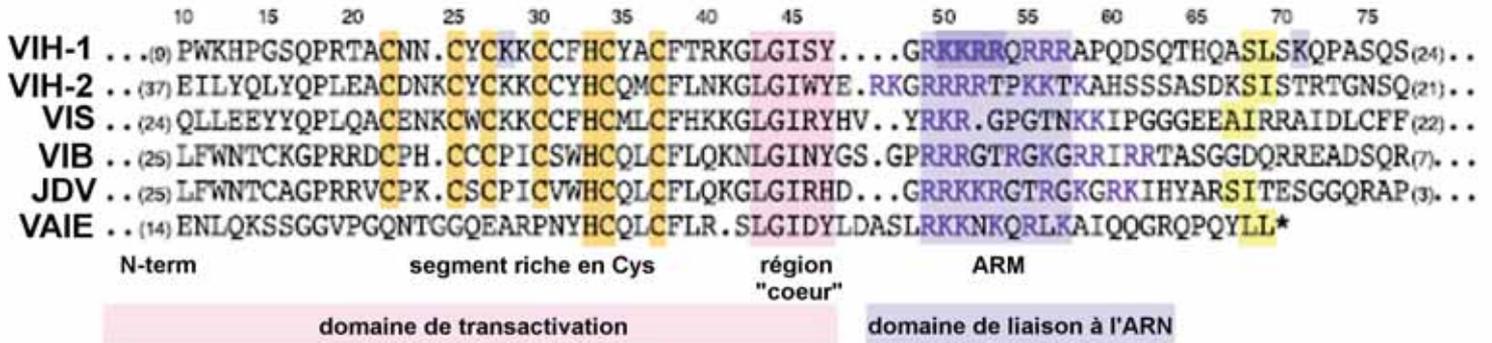


Figure 31 : La protéine Tat comporte plusieurs régions fonctionnelles conservées au cours de l'évolution entre les Lentivirus

Alignement de séquence des protéines Tat issues de différents Lentivirus, les Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 et 2 (VIH-1 et VIH-2), le Virus de l'Immunodéficience Simienne (VIS), le Virus de l'Immunodéficience Bovine (BIV), le Virus de la maladie de Jembrana (JDV), et le Virus de l'Anémie Infectieuse équine (VAIE).

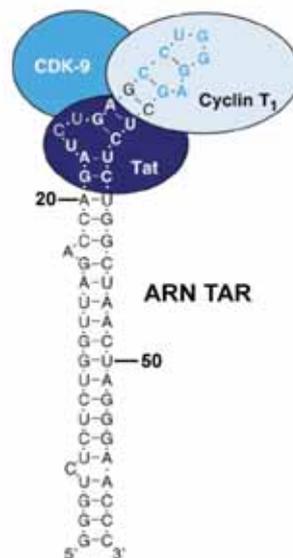


Figure 32 : Liaison de la protéine Tat et du complexe P-TEFb à l'ARN TAR

Au sein de l'ARN TAR du VIH-1, les nucléotides +19 à +43 constituent l'élément de réponse minimal nécessaire et suffisant pour la liaison de Tat. La boucle latérale UCU de l'ARN TAR est essentielle pour la liaison de la protéine Tat, tandis que la boucle apicale constituée de six nucléotides est essentielle pour la liaison de la CycT1 du complexe P-TEFb.

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -
Chapitre V : La transcription du génome du VIH-1

sa sous-unité CycT1 avec le facteur Sp1 lié à l'ADN (Yedavalli et al., 2003). Comme NF- κ B se lie au domaine amino-terminal de la CycT1 (Barboric et al., 2001), tandis que Sp1 se lie à son domaine carboxy-terminal (Yedavalli et al., 2003), il est possible que, dans le contexte du LTR du VIH-1, ces deux facteurs coopèrent pour recruter P-TEFb. De plus, NF- κ B et Sp1 pourraient fonctionner en conjonction avec Brd4 pour recruter P-TEFb au promoteur du VIH-1 (figure 33). En effet, il a été montré qu'en l'absence de Tat, la transcription basale du génome du VIH-1 nécessite également la présence de Brd4 pour le recrutement de P-TEFb au niveau du promoteur viral (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). L'importance fonctionnelle de cette interaction est soulignée par le fait que dans une étude examinant les sites d'intégration du provirus dans des cellules infectées de façon latente par le VIH-1, de multiples intégrations indépendantes ont été relevées dans le gène *Brd4*. Dans ces cellules la perturbation de l'expression de *Brd4* liée à l'intégration du provirus pourrait expliquer la latence du virus (Bisgrove et al., 2007). Des niveaux faibles de NF- κ B, Sp1 et/ou Brd4 pourraient donc permettre le recrutement de P-TEFb au niveau du LTR du VIH-1 pour phosphoryler le CTD de l'ARN pol II, DSIF et NELF. Ceci favoriserait la libération de l'ARN pol II de la pause transcriptionnelle imposée par les N-TEF, permettant ainsi la production de transcrits viraux pleine taille à partir desquels la protéine Tat serait produite. Ce mécanisme de recrutement pourrait fonctionner avant que la protéine Tat du VIH-1 ne soit produite. En effet, lorsque Tat est présente, elle entre en compétition avec Brd4 pour l'interaction avec P-TEFb, et Brd4 est rapidement dissocié du provirus (Yang et al., 2005). Ainsi, après que le premier cycle de transcription est complété, et qu'une petite quantité de Tat est produite, elle stimule efficacement la transcription du VIH-1 en recrutant directement P-TEFb au niveau de l'ARN TAR. Cela établit une boucle de contrôle positif, et une réplication optimale du virus s'ensuit.

P-TEFb est donc un co-facteur essentiel pour l'activation de la transcription du génome du VIH-1. L'importance de P-TEFb est soulignée par le fait qu'une restriction des niveaux de P-TEFb libre causée par sa séquestration dans la snRNP 7SK contribue à l'établissement de la latence transcriptionnelle post-intégrative du VIH-1 dans des cellules infectées (Tyagi et al., 2010). Or, de façon surprenante, il a récemment été montré que l'infection par le VIH-1 de lymphocytes primaires ou de cellules HeLa en culture entraîne une diminution des niveaux de snRNP 7SK contenant le complexe P-TEFb et une augmentation concomitante des niveaux de P-TEFb libre dans les cellules infectées (Barboric et al., 2007; Sedore et al., 2007). Cela suggère que le VIH-1 est capable de libérer le complexe P-TEFb de la snRNP 7SK inactive, probablement pour augmenter le niveau de P-TEFb libre disponible pour la transcription de ses gènes. Il a été montré que l'expression de la protéine Tat dans des cellules en culture entraîne également la libération de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK (Barboric et al., 2007; Sedore et al., 2007). En plus de son rôle dans le recrutement de P-TEFb au niveau de l'ARN TAR, la protéine Tat pourrait donc jouer un rôle dans la libération de P-TEFb de la snRNP 7SK lors de l'infection des cellules par le VIH-1. La snRNP 7SK est une source idéale de P-TEFb puisqu'elle séquestre environ la moitié des complexes P-TEFb cellulaires (Chen et al., 2004; Li et al., 2005). Le mécanisme précis utilisé par Tat pour extraire P-TEFb de la snRNP 7SK n'est pas clairement défini. Néanmoins, cette extraction est probablement liée aux nombreuses similarités de structure et de séquence entre la snRNP 7SK/HEXIM/P-TEFb et le complexe Tat/TAR/P-TEFb (Zhou and Yik, 2006). Tat et HEXIM se lient à la même région de la CycT1, suggérant que les interactions de Tat et HEXIM avec la CycT1 sont mutuellement exclusives (Garber et al., 1998b; Schulte et al., 2005). Or, Tat interagit avec la CycT1 avec une plus forte affinité qu'HEXIM (Barboric et al., 2007; Schulte et al., 2005), ce qui lui permettrait de déplacer directement HEXIM1 de la CycT1 et donc de libérer

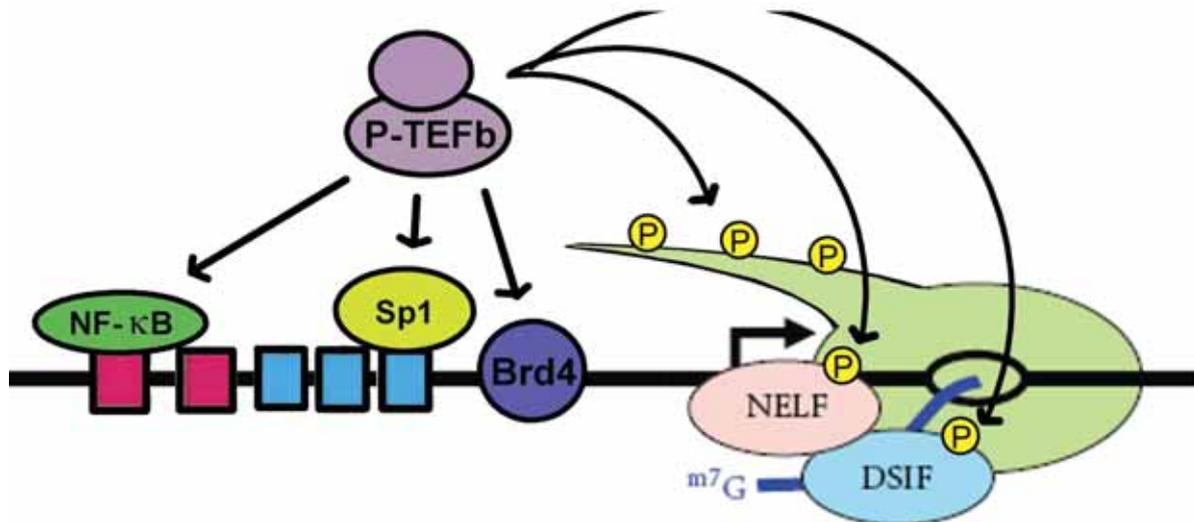


Figure 33 : Recrutement de P-TEFb au niveau du promoteur LTR du VIH-1 en l'absence de la protéine virale Tat

Après l'initiation de la transcription à partir du promoteur LTR (Long Terminal Repeat) du Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1), la progression de l'ARN pol II est bloquée par l'action des facteurs négatifs d'élongation, NELF et DSIF. Le premier cycle de transcription se déroulant en l'absence de la protéine virale Tat, les facteurs NF- κ B, Sp1 et/ou Brd4 pourraient recruter P-TEFb au niveau du LTR du VIH-1. La phosphorylation du CTD de l'ARN pol II, de DSIF et de NELF par P-TEFb permet la reprise de l'élongation de la transcription et la production de transcrits viraux pleine taille. La région LTR du VIH-1 contient trois répétitions en tandem du site de liaison pour le facteur de transcription Sp1 (carrés bleu) et deux sites de liaison pour NF κ B (carrés roses).

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE-
Chapitre V : La transcription du génome du VIH-1

efficacement P-TEFb de la snRNP 7SK. De plus, le motif de liaison au snARN 7SK d'HEXIM1 contient un groupe de résidus chargés positivement dont une partie présente une très forte homologie avec le motif de liaison à l'ARN TAR de la protéine Tat du VIH-1 (Yik et al., 2004). Il a ainsi été montré *in vitro*, que la protéine Tat entre en compétition avec HEXIM pour la liaison au snARN 7SK, et que même lorsque le complexe relativement stable 7SK/HEXIM est pré-formé, Tat peut le désassembler (Sedore et al., 2007).

PRESENTATION DU SUJET

Le snARN 7SK est un petit ARN non codant très abondant dans les cellules qui joue un rôle crucial dans la régulation de la transcription par l'ARN pol II. Il est capable, en coopération avec la protéine HEXIM, de séquestrer de façon dynamique et réversible le facteur d'élongation P-TEFb, au sein d'une petite particule ribonucléoprotéique nucléaire appelée snRNP 7SK, pour inhiber son activité kinase. Le snARN 7SK contrôle ainsi finement le taux de P-TEFb actif dans les cellules, régulant ainsi l'élongation de la transcription par l'ARN pol II. Au cours de ma thèse, je me suis attachée à mieux caractériser les éléments à la base de l'assemblage de la snRNP 7SK séquestrant P-TEFb et de son désassemblage par la protéine Tat du VIH-1.

En effet, tandis que de nombreux signaux pouvant entraîner la libération de P-TEFb de la snRNP 7SK ont été identifiés, les mécanismes moléculaires à la base de cette libération ne sont pas tous bien définis. Or, il a récemment été montré que la protéine Tat du VIH-1 peut entraîner la libération de P-TEFb de la snRNP 7SK. L'étude du mécanisme permettant à cette protéine de désassembler la snRNP 7SK séquestrant P-TEFb pourrait apporter de nouveaux éléments pour comprendre comment l'équilibre entre les formes active et inactive de P-TEFb peut être modifié dans les cellules en réponse à divers stimuli. C'est pourquoi nous avons cherché à définir le mécanisme par lequel la protéine Tat du VIH-1 libère P-TEFb de la snRNP 7SK.

Au sein de la snRNP 7SK séquestrant le facteur P-TEFb, le snARN 7SK joue un rôle central en servant de plateforme structurale pour l'assemblage coordonné d'HEXIM et de P-TEFb. Or, la stabilité du snARN 7SK et donc la formation des snRNP 7SK dépend des protéines MePCE et LARP7. Les protéines LARP7 et MePCE protègent respectivement les extrémités 3' et 5' du snARN 7SK contre la dégradation par des exonucléases. Ces deux protéines qui restent associées au snARN 7SK lorsque P-TEFb et HEXIM sont libérés, jouent un rôle essentiel dans le maintien de la stabilité du snARN 7SK et donc dans la formation de la snRNP 7SK. Afin de mieux comprendre les interactions moléculaires à la base de l'assemblage de la snRNP 7SK régulant la disponibilité de P-TEFb dans les cellules, nous nous sommes attachés à délimiter avec précision les régions du snARN 7SK cruciales pour l'interaction avec LARP7 et MePCE.

PARTIE II
-RESULTATS-

-RESULTATS-

Chapitre I : Mécanisme utilisé par la protéine Tat du VIH-1 pour libérer P-TEFb de la snRNP 7SK

Chapitre I : Mécanisme utilisé par la protéine Tat du VIH-1 pour libérer P-TEFb de la snRNP 7SK

I) Etat du domaine

Le facteur de transcription général P-TEFb est requis pour l'expression efficace d'une majorité de gènes cellulaires. Une dérégulation de son activité peut être à l'origine de maladies graves. Son activité doit donc être finement régulée pour répondre aux changements en besoins transcriptionnels de la cellule aux différents stades de différenciation ou de croissance. L'un des mécanismes majeurs de régulation de l'activité de P-TEFb est son association réversible au sein de la snRNP 7SK avec le snARN 7SK et les protéines HEXIM. Au sein de ce complexe l'activité kinase de P-TEFb est inhibée, formant ainsi un réservoir de P-TEFb inactif mobilisable par la cellule à tout moment. Cela permet le maintien d'un équilibre fonctionnel entre les formes active et inactive de P-TEFb. Même si l'on connaît de nombreux agents pouvant induire le désassemblage de la snRNP 7SK, les mécanismes à l'origine de ce désassemblage restent moins bien décrits. Or, il a récemment été montré que la protéine Tat du VIH-1 est capable de libérer le complexe P-TEFb de la snRNP 7SK (Barboric et al., 2007; Sedore et al., 2007).

II) Question posée et démarche expérimentale

La détermination du mécanisme permettant à la protéine Tat de désassembler la snRNP 7SK pourrait nous en apprendre un peu plus sur les éléments à l'origine des changements dans l'équilibre entre les formes active et inactive de P-TEFb. Nous nous sommes donc penchés sur l'étude du mécanisme permettant à la protéine Tat du VIH-1 de désassembler la snRNP 7SK entraînant ainsi la libération de P-TEFb. Il a été proposé que la protéine Tat du VIH-1 entraîne la libération de P-TEFb de la snRNP 7SK en entrant en compétition avec HEXIM soit pour la liaison à la CycT1 du complexe P-TEFb, soit pour la liaison au snARN 7SK (Barboric et al., 2007; Sedore et al., 2007). Pour définir plus clairement le mécanisme employé par Tat pour extraire P-TEFb de la snRNP 7SK, nous avons vérifié si l'interaction identifiée *in vitro* entre Tat et le snARN 7SK (Sedore et al., 2007) existe *in vivo*. Nous avons ensuite cherché à définir les éléments du snARN 7SK nécessaires pour l'interaction avec la protéine Tat. Pour ce faire, nous avons entrepris une analyse mutationnelle systématique du snARN 7SK. Une batterie de snARN 7SK mutants portant diverses délétions ou mutations ponctuelles ont été co-exprimés avec une version étiquetée de la protéine Tat du VIH-1 dans des cellules humaines en culture. Des expériences de co-immunoprécipitation nous ont permis de tester la capacité des divers mutants du snARN 7SK à interagir avec Tat. Les résultats de ces expériences nous ont poussés à définir de manière plus détaillée les éléments du snARN 7SK nécessaires pour la liaison des protéines HEXIM. Pour cela, nous avons analysé par retard sur gel l'interaction des protéines HEXIM avec des versions tronquées du snARN 7SK. Les résultats ainsi obtenus *in vitro* ont été confirmés et précisés *in vivo* par des expériences de co-immunoprécipitation d'une version étiquetée d'HEXIM avec des mutants du snARN 7SK exprimés transitoirement dans des cellules humaines en culture. Nous avons ensuite cherché à démontrer l'existence *in vivo* d'une compétition entre Tat et HEXIM pour la liaison au snARN 7SK. Pour cela, nous avons exprimé transitoirement une version étiquetée de la protéine Tat dans des cellules humaines en culture et analysé par des expériences de co-immunoprécipitation l'interaction entre les protéines HEXIM et le snARN 7SK endogènes.

-RESULTATS-

Chapitre I : Mécanisme utilisé par la protéine Tat du VIH-1 pour libérer P-TEFb de la snRNP 7SK

Comme nous l'avons vu dans le chapitre III, une fraction du snARN 7SK s'associe avec des protéines de type hnRNP, parmi lesquelles hnRNP A1, hnRNP B1, hnRNP Q et hnRNP R (Barrandon et al., 2007; Hogg and Collins, 2007; Van Herreweghe et al., 2007). De plus, l'association du snARN 7SK avec ces protéines augmente après sa libération de la snRNP 7SK contenant le complexe P-TEFb induite par un stress. Afin de vérifier si la protéine Tat du VIH-1 peut s'associer au complexe snARN 7SK/hnRNP, une version étiquetée de la protéine Tat a été exprimée transitoirement dans des cellules humaines en culture et son interaction avec les protéines hnRNP a été analysée par co-immunoprécipitation.

III) Résultats

Les résultats de ces études sont présentés dans la publication ci-après :

« Controlling cellular P-TEFb activity by the HIV-1 transcriptional transactivator Tat ».

Controlling Cellular P-TEFb Activity by the HIV-1 Transcriptional Transactivator Tat

Lisa Muniz¹, Sylvain Egloff¹, Bettina Ughy^{1,2}, Beáta E. Jály¹, Tamás Kiss^{1,2*}

1 Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote du CNRS, UMR5099, IFR109 CNRS, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, **2** Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary

Abstract

The human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) transcriptional transactivator (Tat) is essential for synthesis of full-length transcripts from the integrated viral genome by RNA polymerase II (Pol II). Tat recruits the host positive transcription elongation factor b (P-TEFb) to the HIV-1 promoter through binding to the transactivator RNA (TAR) at the 5'-end of the nascent HIV transcript. P-TEFb is a general Pol II transcription factor; its cellular activity is controlled by the 7SK small nuclear RNA (snRNA) and the HEXIM1 protein, which sequester P-TEFb into transcriptionally inactive 7SK/HEXIM/P-TEFb snRNP. Besides targeting P-TEFb to HIV transcription, Tat also increases the nuclear level of active P-TEFb through promoting its dissociation from the 7SK/HEXIM/P-TEFb RNP by an unclear mechanism. In this study, by using *in vitro* and *in vivo* RNA-protein binding assays, we demonstrate that HIV-1 Tat binds with high specificity and efficiency to an evolutionarily highly conserved stem-bulge-stem motif of the 5'-hairpin of human 7SK snRNA. The newly discovered Tat-binding motif of 7SK is structurally and functionally indistinguishable from the extensively characterized Tat-binding site of HIV TAR and importantly, it is imbedded in the HEXIM-binding elements of 7SK snRNA. We show that Tat efficiently replaces HEXIM1 on the 7SK snRNA *in vivo* and therefore, it promotes the disassembly of the 7SK/HEXIM/P-TEFb negative transcriptional regulatory snRNP to augment the nuclear level of active P-TEFb. This is the first demonstration that HIV-1 specifically targets an important cellular regulatory RNA, most probably to promote viral transcription and replication. Demonstration that the human 7SK snRNA carries a TAR RNA-like Tat-binding element that is essential for the normal transcriptional regulatory function of 7SK questions the viability of HIV therapeutic approaches based on small drugs blocking the Tat-binding site of HIV TAR.

Citation: Muniz L, Egloff S, Ughy B, Jály BE, Kiss T (2010) Controlling Cellular P-TEFb Activity by the HIV-1 Transcriptional Transactivator Tat. *PLoS Pathog* 6(10): e1001152. doi:10.1371/journal.ppat.1001152

Editor: Bryan R. Cullen, Duke University Medical Center, United States of America

Received: March 31, 2010; **Accepted:** September 13, 2010; **Published:** October 14, 2010

Copyright: © 2010 Muniz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: L.M. and S.E. were supported by fellowships from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie and Association pour la Recherche contre le Cancer. Our work was supported by la Fondation pour la Recherche Médicale and Agence Nationale de Recherches sur le SIDA. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: tamas@ibcg.biotoul.fr

Introduction

Synthesis of mRNAs by Pol II is tightly controlled at the step of transcription elongation by the positive transcription elongation factor b (P-TEFb) that is a cyclin-dependent kinase composed of Cdk9 and cyclin T1 (CycT1) [1,2,3,4,5]. After transcription initiation and promoter clearance, Pol II is arrested by the negative elongation factor (NELF) and the DRB sensitivity-inducing factor (DSIF). To restore productive Pol II elongation, P-TEFb phosphorylates NELF, DSIF and the heptapeptide repeats (YSPTSPS) in the C-terminal domain (CTD) of Pol II at serine 2. P-TEFb is a general transcription factor that is required for efficient expression of most protein-coding genes as well as for production of full-length transcripts from the integrated HIV-1 genome [6,7].

In the nuclei of HeLa cells, about half of P-TEFb forms a kinase-inactive ribonucleoprotein (RNP) with the 7SK snRNA [8,9]. The 7SK/P-TEFb snRNP also contains the hexamethylene bisacetamide (HMB)-inducible protein HEXIM1 and less often, HEXIM2 [10,11,12,13], the La-related protein Larp7 [14,15,16] and the methylphosphate capping enzyme MePCE [17,18]. While Larp7 and MePCE bind stably to and provide stability for 7SK snRNA, P-TEFb and HEXIM1/2 show a dynamic, transcription-

dependent association with 7SK. Blocking of Pol II transcription induces dissociation of P-TEFb and HEXIM proteins from the 7SK snRNP to increase the nuclear level of active P-TEFb [8,9,10,11]. On the contrary, inhibition of cell growth shifts P-TEFb from active to inactive 7SK-associated complexes [19,20]. Thus, the 7SK snRNA and HEXIM1/2 proteins function as key regulators of Pol II transcription through controlling the nuclear activity of P-TEFb. Malfunction of the 7SK-P-TEFb regulatory machine that abnormally increases P-TEFb activity can lead to development of cardiac hypertrophy or to malignant transformation of the cell [16,21].

The human 7SK is a 331 nt-long Pol III-transcribed abundant snRNA [22]. P-TEFb is tethered to 7SK through interacting with HEXIM1 and HEXIM2 that directly bind to the 5' hairpin of 7SK snRNA in the forms of homo- or heterodimers [11,12,13,23,24,25,26,27]. HEXIM proteins interact with two copies of P-TEFb and inhibit their protein kinase activity strictly in a 7SK snRNA-dependent manner [11,27]. Binding of 7SK to the positively charged RNA-binding motif of HEXIM1/2 enables the acidic P-TEFb-binding domain of HEXIM1/2 to interact with CycT1 [28]. *In vivo* docking and inactivation of P-TEFb by the 7SK snRNP also requires the binding of CycT1, either directly or indirectly, to the 3' hairpin of 7SK snRNA [26].

Author Summary

Expression and replication of the human immunodeficiency virus (HIV) is supported by the viral transcriptional transactivator (Tat) that recruits the host positive transcription elongation factor b (P-TEFb) to the promoter of the integrated viral genome. Here, we demonstrate that HIV Tat specifically and efficiently binds to the host 7SK small nuclear RNA (snRNA) that is a negative regulator of P-TEFb. Although HIV Tat has been reported to interact with a plethora of host factors, our results indicate that the 7SK transcriptional regulatory snRNA is a major and important cellular target of HIV Tat. We demonstrate that binding of Tat to the 7SK snRNA disrupts the 7SK-P-TEFb negative transcriptional regulatory complex and releases active P-TEFb. Thus, we propose that Tat not only targets P-TEFb for HIV transcription, but also modulates the nuclear level of active P-TEFb in HIV-infected cells.

Transcription initiated from the long terminal repeat (LTR) promoter of the integrated HIV-1 genome is controlled predominantly at the level of elongation [1,29,30]. The processivity of HIV transcription depends on the viral transactivator Tat that recruits P-TEFb to the stalled Pol II [31,32]. To capture P-TEFb, the activation domain of Tat associates with CycT1 and its RNA-binding motifs binds to the transactivation response element, TAR, an RNA hairpin at the 5' end of the nascent HIV LTR transcript [33,34,35,36]. Besides tethering P-TEFb to the TAR RNA, recent studies demonstrated that Tat also promotes the disassembly of the 7SK/HEXIM/P-TEFb snRNP to increase the nuclear level of active P-TEFb [37,38]. Indeed, efficient transcription from the HIV LTR promoter requires considerably higher P-TEFb activity than that is needed for cellular mRNA production and host cell viability [6,31,39,40,41].

The molecular mechanism of Tat-mediated regulation of nuclear P-TEFb activity is unclear. Tat has been proposed to compete with HEXIM to displace it either from the CycT1 subunit of P-TEFb or from the 7SK snRNA [37,38]. In this study, we demonstrate that in HIV-infected cells, the 7SK transcriptional regulatory snRNA is the major RNA target of the accumulating Tat protein. HIV Tat binds with high specificity and efficiency to an evolutionarily highly conserved TAR RNA-like stem-bulge-stem motif of the 5' hairpin of 7SK snRNA. We demonstrate that the newly discovered Tat-binding site of 7SK is imbedded in the HEXIM-binding elements of 7SK and therefore, Tat promotes disassembly of the 7SK/HEXIM/P-TEFb negative transcriptional regulatory snRNP through displacing the HEXIM homodimer from the 7SK snRNA.

Results

HIV Tat specifically associates with 7SK snRNA *in vivo*

To test whether Tat can interact with 7SK snRNA in living cells, Flag-tagged Tat (Tat-FL) was transiently expressed in human HeLa cells and recovered by immunoprecipitation (IP) with an anti-Flag antibody (Figure 1A). As demonstrated by Western blot analysis, the expressed Tat-FL protein interacted with the Paf1 component of the recently reported Tat/P-TEFb-associated elongation complex, indicating that it was functionally active [42]. HeLa RNAs co-precipitated with Tat-FL were 3' end-labeled with [5'-³²P]pCp and T4 RNA ligase and analyzed on a denaturing gel (Figure 1B, lane 2). Autoradiography revealed that Tat-FL bound to a unique RNA with an electrophoretic mobility corresponding to the 331 nt-long human 7SK snRNA. To

determine unequivocally its identity, the terminally labeled Tat-associated RNA was partially digested with the G-specific endoribonuclease T1 or it was moderately hydrolyzed with alkali before fractionation on a sequencing gel (Figure 1C). Distribution of the G residues in the 3'-terminal part of the Tat-associated HeLa RNA perfectly matched with the nucleotide sequence of human 7SK snRNA. The faint band duplications above the RNase T1 digestion products indicate sequence heterogeneity at the 3' end of 7SK snRNA [43].

To rule out that Tat-FL associated with 7SK in the cell extract, we performed *in vivo* cross-linking experiments (Figure 1D). HeLa cells expressing Tat-FL were treated with formaldehyde and after extract preparation, Tat-FL was immunoprecipitated under highly stringent conditions [44]. RNase A/T1 protection analysis confirmed that 7SK snRNA was efficiently cross-linked to Tat-FL *in vivo* (lane 5). In control IPs performed in the absence of antibody (lane 4) or from non-cross-linked cell extract (lane 2), no 7SK-Tat-FL interaction was detected under the applied harsh wash conditions. We concluded that Tat specifically and most probably, directly interacts with 7SK snRNA in living cells.

The 5' hairpin of human 7SK snRNA carries a conserved Tat-binding element

To define the region of 7SK snRNA which interacts with Tat, we assayed the *in vivo* interaction of transiently expressed truncated 7SK RNAs with Tat-FL by IP with an anti-Flag antibody followed by Northern blot analysis (Figure 2A). Co-precipitation of the endogenous HeLa 7SK snRNA with Tat-FL provided a positive control for each IP reaction. Removal of the 3' hairpin of 7SK, although largely compromised the stability of the truncated d3'HP RNA (lanes 9 and 11), failed to prevent its association with Tat-FL (lane 12). In contrast, deletion of the 5' hairpin eliminated the interaction of d5'HP RNA with Tat-FL (lane 8). Finally, the 5'HP RNA that represented the 5' hairpin of 7SK efficiently interacted with Tat-FL (lane 4), demonstrating that HIV Tat binds to the 5' hairpin of 7SK snRNA.

Tat recognizes an internal stem-bulge-stem motif of HIV TAR RNA (Figure 2B). The first uridine in the bulge and the G-C and A-U base-pairs in the upper stem are indispensable for Tat binding [45,46,47,48]. A structural rearrangement of the bulge loop provides the specificity for the Tat-TAR interaction. The bulged U forms a base-triple interaction with the A-U base-pair that stabilizes the association of the lower G residue in the major groove with an arginine of Tat [49,50]. We noticed that the 5' hairpin of human 7SK snRNA carries two internal segments, G18-A27/U84-C90 and C37-C45/G64-G70, which are highly reminiscent of the consensus minimal structure of the Tat-binding element of HIV TAR (Figure 2C, shaded boxes). The putative distal (upper) Tat-binding element of human 7SK shows a striking conservation in all known 7SK snRNAs derived from phylogenetically distant species.

To test whether the newly detected potential Tat-binding motifs of human 7SK snRNA can interact with Tat, we performed electrophoretic mobility shift assays using *in vitro* synthesized probe RNAs representing either the distal (Dist) or the proximal (Prox) parts of the 5' hairpin of 7SK and a Tat-derived oligopeptide, Tat(38–72) [51] (Figure 3A). The Tat peptide efficiently bound to the distal part of the 5' hairpin of 7SK (lanes 2–4), but failed to associate with its proximal part (lane 7–9). Administration of cold Dist RNA abolished association of the Tat oligopeptide with 7SK sequences, confirming that Tat binds specifically to the distal part of the 5' hairpin of human 7SK snRNA (lane 5).

The 5' hairpin of human 7SK contains two 10 nt-long perfect repeats (G13–G22 and G64–G73) which overlap the distal and proximal putative Tat-binding elements (Figure 3A, indicated by

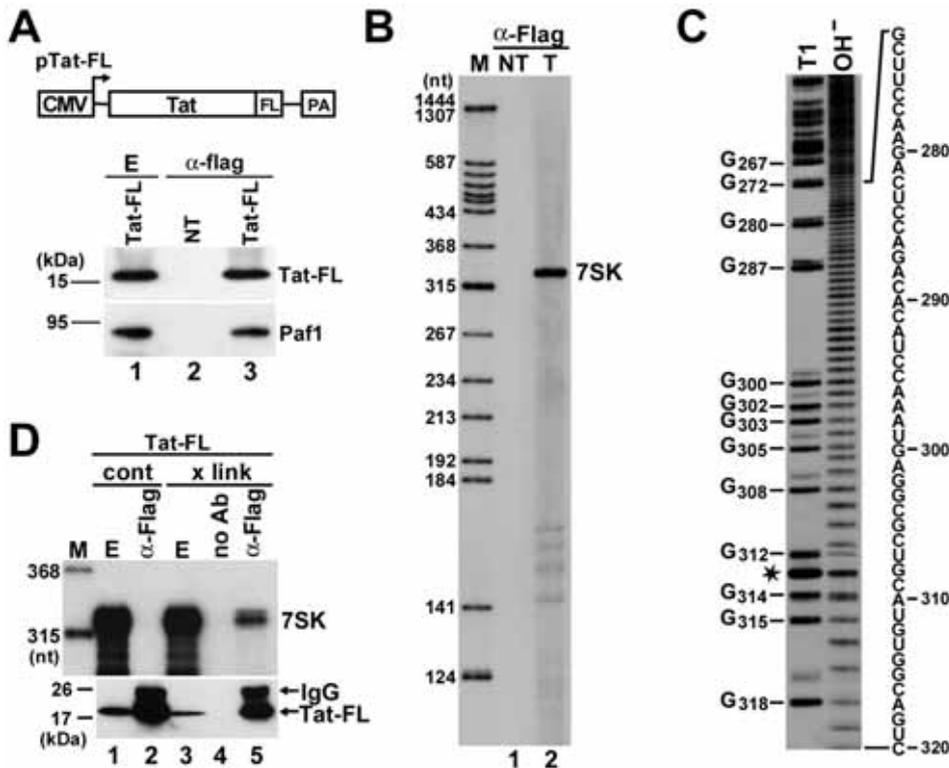


Figure 1. *In vivo* association of HIV Tat with 7SK. A. Transient expression of Tat-FL in HeLa cells. Schematic structure of the pTat-FL expression construct is shown. The cytomegalovirus promoter (CMV) and the polyadenylation region (PA) are indicated. Tat-FL was immunoprecipitated (α -Flag) from extracts (E) prepared from transfected or non-transfected (NT) cells. Distribution of Tat-FL and Paf1 was monitored by Western blot analysis. B. Detection of Tat-associated HeLa RNAs. RNAs co-precipitated with Tat-FL (T) were labeled *in vitro* and separated on a 6% sequencing gel. Lanes NT and M, control IP from non-transfected cells and molecular size markers. C. RNA G-tracking. The Tat-associated RNA was partially digested with RNase T1 or moderately hydrolyzed with formamide (OH⁻) and analyzed on a 6% gel. G residues and their positions in the human 7SK snRNA sequence are indicated. Asterisk indicates a fragile U residue. D. *In vivo* cross-linking of Tat-FL and 7SK. HeLa cells expressing Tat-FL were treated (x link) or not treated (cont) with formaldehyde before extract (E) preparation. Tat-FL was immunoprecipitated (α -Flag) or mock-precipitated (no Ab) under stringent conditions. Distributions of Tat-FL and 7SK snRNA were monitored by Western blot analysis and RNase A/T1 mapping, respectively. doi:10.1371/journal.ppat.1001152.g001

arrows). The wild-type GAUCUGGCUG repeat sequences were replaced with complementary sequences in the p5'HP expression plasmid (Figure 3B). The mutant 5'HPdm (distal mutant) and 5'HPpm (proximal mutant) RNAs were transiently expressed in HeLa cells and their association with the co-expressed Tat-FL protein was tested. Northern blot analysis demonstrated that Tat-FL interacted with 5'HPpm RNA (lane 4), but it failed to associate with the 5'HPdm and the double mutant 5'HPpm+dm RNAs (lanes 8 and 12), providing strong support to the notion that Tat interacts with the distal Tat-binding motif of human 7SK snRNA.

To confirm that Tat binds to the C37–C45/G64–G70 TAR RNA-like motif of human 7SK, a series of mutant 5'HP RNAs were transiently expressed and their association with Tat-FL was examined (Figure 3C). Substitution of the U40, U40–U41 bulge nucleotides or the A43, G42–A43, U63–C67 and U68–G70 stem nucleotides for complementary sequences fully abolished the *in vivo* association of the expressed mutant 5'HP RNAs with Tat-FL (lanes 4, 12, 16, 20, 24 and 28). In contrast, substitution of the U72–C75 nucleotides failed to interfere with Tat binding (lane 8). Likewise, replacing the U63 bulge nucleotide, the G60–C62 stem or the A49–C59 loop sequences with complementary nucleotides had no effect on *in vivo* Tat binding (data not shown). We concluded that Tat binds to the evolutionarily conserved C37–C45/G64–G70 motif of 7SK that is structurally indistinguishable from the Tat-binding element of HIV TAR.

The 5' hairpin of human 7SK snRNA carries two HEXIM-binding sites

The strong evolutionary conservation of the newly identified Tat-binding site of human 7SK suggests that this element plays an important role in the normal function of 7SK snRNA (Figure 2C). The positively charged arginine-rich TAR-recognition motif of HIV Tat shows strong similarity to the N-terminal part of the 7SK-binding motif of HEXIM proteins derived from evolutionarily distant species (Figure S1) [52]. This suggests that Tat and HEXIM recognize similar, if not identical, target motif(s) in the 5' hairpin of 7SK. HEXIM1 has been reported to be a promiscuous double-stranded RNA-binding protein that binds to 7SK between nucleotides 10 to 48 in a sequence-independent manner [53]. In contrast, we had earlier observed that in HeLa cells HEXIM1 binds to the distal part of the 5' hairpin of 7SK with high specificity [26]. To clarify these inconsistencies and to define the precise binding site of HEXIM, we performed electrophoretic mobility shift assays (Figure 4A). When the entire 5' hairpin of 7SK (5'HP) was incubated with increasing amounts of recombinant HEXIM1, two 5'HP-HEXIM1 complexes, indicated as shift 1 and 2, were detected on a native gel (lanes 2–6). In the presence of about two-fold excess of HEXIM1 only the upper low-mobility complex (shift 2) was formed (lane 6). Administration of cold 5'HP RNA inhibited 5'HP-HEXIM1 complex formation (lanes 7–9), indicating that in accordance with previous reports, the 5' hairpin

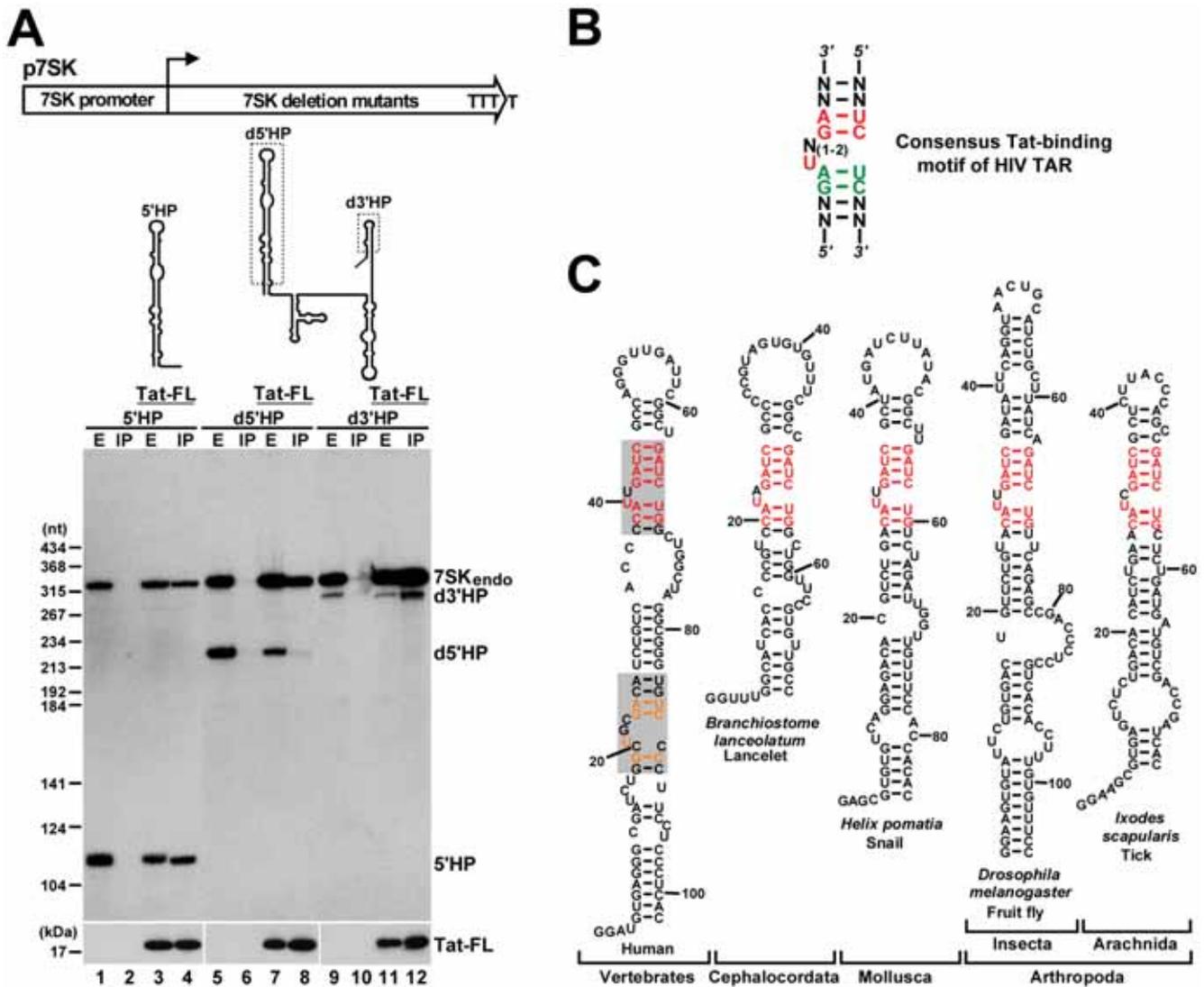


Figure 2. Identification of putative Tat-binding motifs in 7SK snRNA. A. Tat binds to the 5' hairpin of 7SK. Schematic structures of the p7SK expression construct and the expressed truncated 7SK RNAs are shown. Dashed boxes indicate deletions. Pol III transcription of the 7SK gene terminates within four consecutive T residues. HeLa cells were transfected with the indicated expression plasmids. After extract (E) preparation, Tat-FL was immunoprecipitated (IP). Distribution of the endogenous and transiently expressed 7SK RNAs and Tat-FL was monitored by Western and Northern blotting. B. Consensus structure of the minimal Tat-binding motif of HIV TAR. Nucleotides with essential and moderate contribution to Tat binding are in red and green, respectively. C. Phylogenetic comparison of the 5' hairpins of 7SK snRNAs. The sequences of lancelet, snail, fruit fly and tick 7SK snRNAs have been published [65,66]. The potential Tat-binding motifs of human 7SK snRNA are shaded. The evolutionarily invariant nucleotides are in red. Nucleotides common to the putative proximal Tat-binding motif of 7SK and the Tat-binding site of HIV TAR are in orange.
doi:10.1371/journal.ppat.1001152.g002

of 7SK specifically associates with two molecules of HEXIM1 [13,24,25].

When probe RNAs representing the proximal (Prox) and distal (Dist) regions of the 5' hairpin of 7SK were incubated with HEXIM1, HEXIM1 specifically associated with both RNAs (lanes 11–13 and lanes 16–18). The resulting Dist-HEXIM1 and Prox-HEXIM1 complexes co-migrated with the high-mobility complex (shift1) formed by the full-length 5' hairpin and HEXIM1. Importantly, neither the Dist nor the Prox probe RNA formed the large low-mobility complex (shift 2) with HEXIM1, demonstrating that the 5' hairpin of 7SK contains two structurally and functionally independent HEXIM-binding sites each recruiting one HEXIM molecule in an independent fashion *in vitro*.

We tested whether the newly defined distal Tat-binding element and the proximal Tat-binding-like motif of the 5' hairpin of 7SK are essential for HEXIM1 binding. Mutant 5' hairpin RNAs, 5'HPdm and 5'HPpm (see Figure 3), were incubated with HEXIM1 and the resulting complexes were analyzed on a native gel (Figure 4B). Both 5'HPdm and 5'HPpm RNAs formed only the high-mobility complex with HEXIM1 (shift 1), indicating that they bind only one copy of HEXIM1 (lanes 3–4 and 8–9). As expected, the double-mutant 5'HPpm+dm RNA was inactive in HEXIM-binding (lanes 12–14). These results confirmed that the newly identified Tat-binding motif in the distal part and the Tat-binding-like element in the proximal part of the 7SK 5' hairpin function in HEXIM-binding.

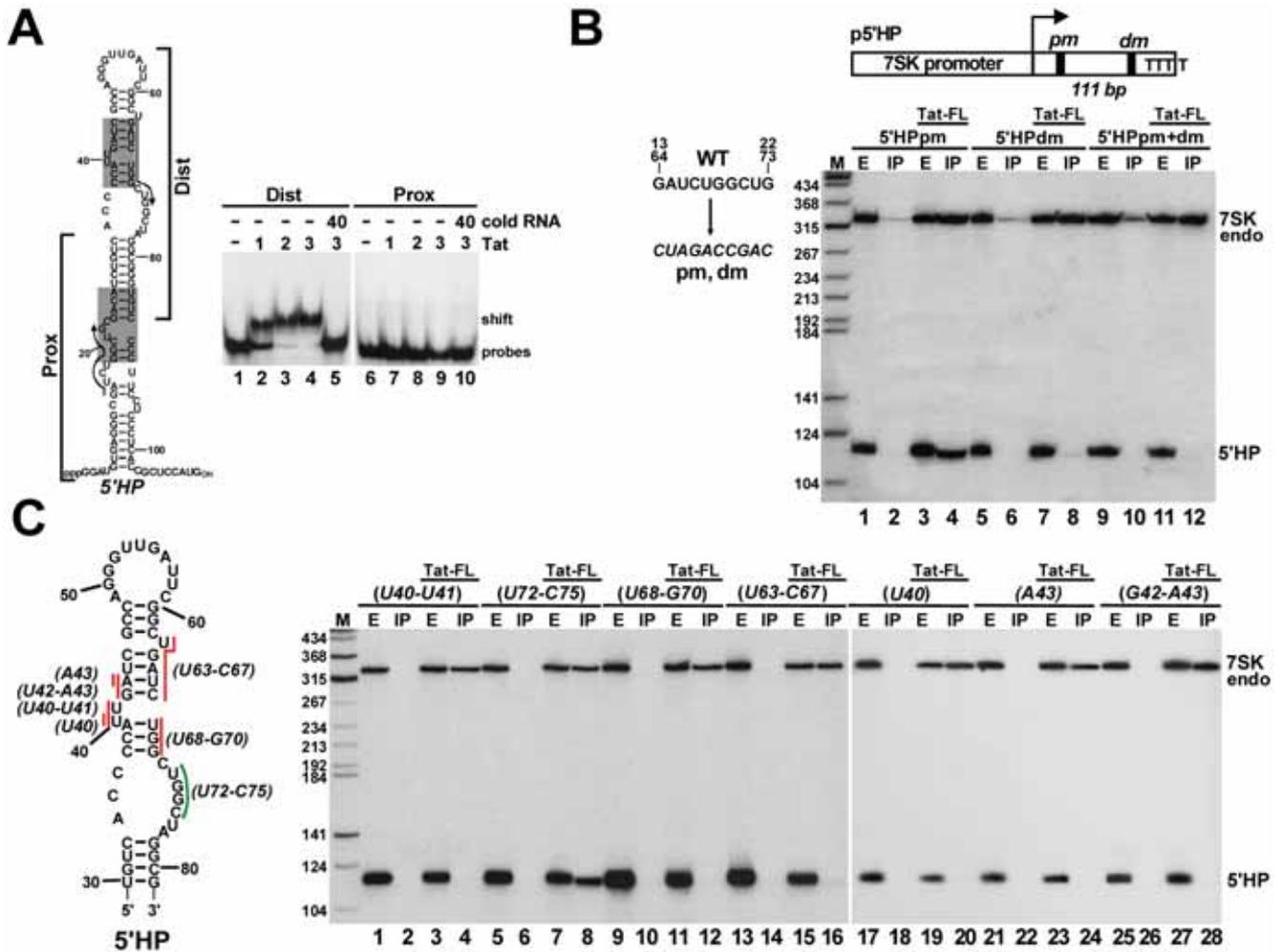


Figure 3. Characterization of the Tat-binding element of human 7SK snRNA. A. Tat binds to the distal part of the 5' hairpin of 7SK. About 2 fmol of ³²P-labeled RNA representing the distal (Dist) or proximal (Prox) part of the 7SK 5' hairpin was incubated with the indicated amount (fmol) of Tat(38–72) oligopeptide and analyzed on a 4% native gel. B. The distal Tat-binding motif of 7SK directs *in vivo* binding of Tat. The 5' hairpin of 7SK (5'HP) carrying the pm and/or dm mutations was co-expressed with Tat-FL and their interaction was tested by co-IP and Northern blotting. Structure of the p5'HP expression plasmid with the pm and dm mutations and the expected length of the 5'HP RNA is shown. C. *In vivo* association of Tat with mutant 7SK 5' hairpin RNAs. Nucleotides indicated by red (essential) or green (dispensable) lines were replaced with complementary nucleotides in the p5'HP expression plasmid. Tat-FL and the mutant 5'HP RNAs were co-expressed in HeLa cells and their interactions were tested.

doi:10.1371/journal.ppat.1001152.g003

To further delimit the snRNA elements directing *in vitro* HEXIM-binding, the distal A34-C45/G64-A77 and proximal C12-A27/U84-U95 fragments of 7SK were topped with GGAA tetraloops and stabilized with artificial basal stems (Figure 4C). The resulting distal and proximal HEXIM-binding site (DHBS and PHBS) RNAs specifically associated with HEXIM1 (lanes 4 and 9). Any further truncations or sequence alterations abolished the HEXIM-binding capacity of the DHBS and PHBS RNAs, indicating that the A34-C45/G64-A77 and C12-A27/U84-U95 internal segments of the 5' hairpin of 7SK contain the minimal sequence and structural information required for *in vitro* recognition by HEXIM1 (data not shown). This conclusion was further corroborated by demonstration that similarly to the control wild-type 5' hairpin (Figure 4D, lane 9), an artificial hairpin RNA (5'HPsyn) encompassing the C12-A25/U86-U95 and A34-C45/G64-A77 fragments of human 7SK was capable of binding two HEXIM1 molecules (lane 4).

The distal and proximal HEXIM-binding sites of 7SK work in an interdependent fashion *in vivo*

Our *in vitro* binding studies revealed that the 5' hairpin of human 7SK snRNA carries two structurally and functionally independent HEXIM-binding sites. However, we had earlier observed that mutations predicted to disrupt the distal HEXIM-binding element of the 5' hairpin fully abolished the *in vivo* HEXIM-binding capacity of 7SK snRNA [26]. A possible interpretation of these contradictory results could be that *in vivo* the two HEXIM-binding sites of 7SK function in an interdependent way. To test this assumption, we investigated the *in vivo* HEXIM-binding ability of the mutant 5'HPpm and 5'HPdm RNAs which still bind one copy of HEXIM1 under *in vitro* conditions (see Figure 4B). The 5'HPpm and 5'HPdm RNAs were transiently expressed in HeLa cells and their association with a co-expressed HA-tagged HEXIM1 was monitored (Figure 5A). The ectopically expressed HA-HEXIM1 protein efficiently associated

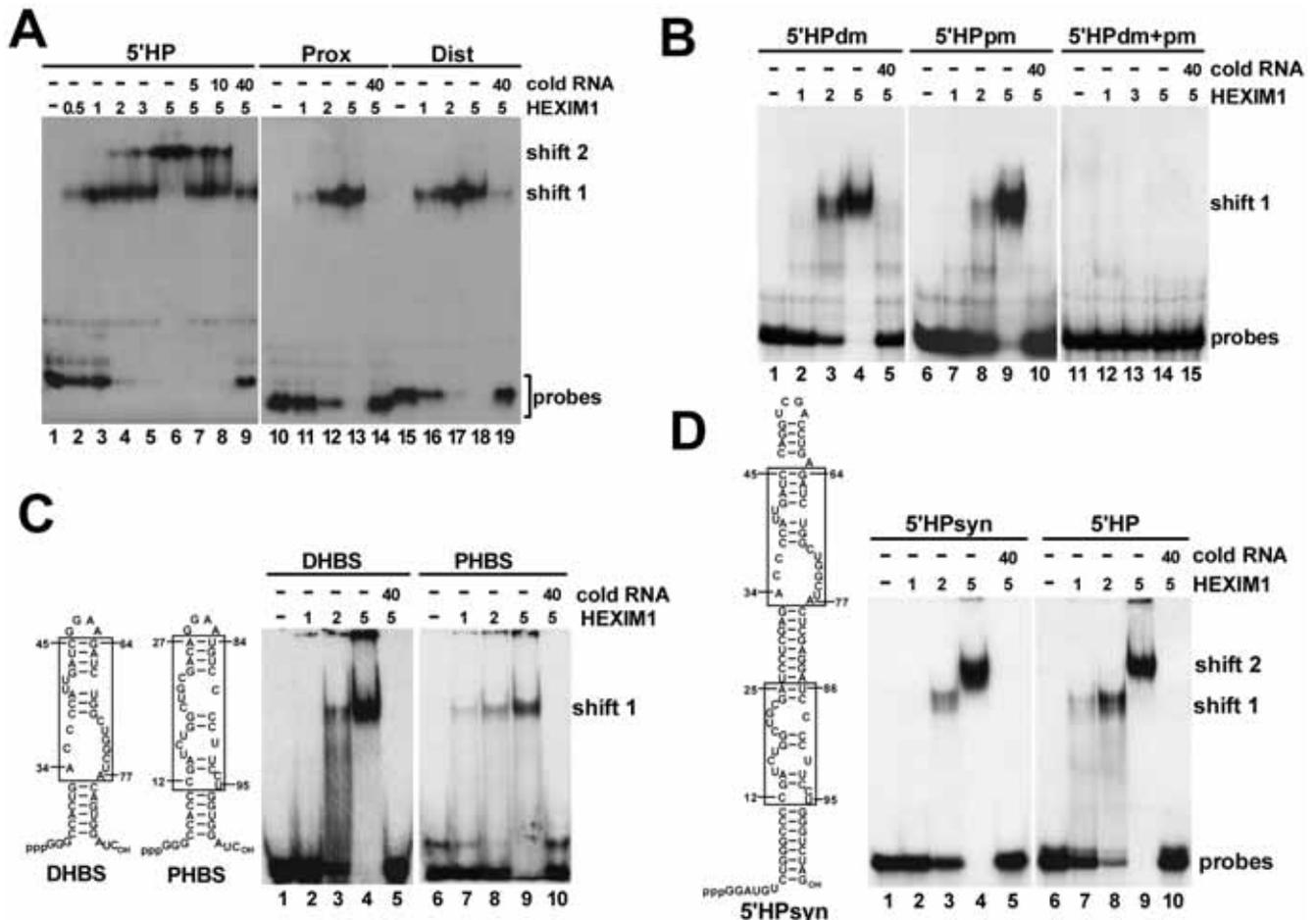


Figure 4. The 5' hairpin of human 7SK snRNA contains two HEXIM-binding sites. A. Detection of HEXIM-binding sites by mobility shift assays. About 2 fmol of *in vitro* synthesized probe RNAs representing the entire (5'HP) or the distal (Dist) and proximal (Prox) parts of the 5' hairpin of human 7SK were incubated with increasing amounts (fmol) of recombinant HEXIM1 and analyzed on a 5% native gel. Appropriate cold RNAs were used as specific competitors. B. *In vitro* interaction of mutant 7SK 5' hairpin RNAs (5'HPdm, 5'HPpm, 5'HPdm+pm) with HEXIM1. Complexes were analyzed on a 4% gel. The minimal HEXIM1-binding elements of 7SK. The *in vitro* HEXIM1-binding capacity of a distal (DHBS) and proximal (PHBS) fragment of the 7SK 5' hairpin was tested by mobility shift assay on a 4% gel. Sequences derived from wild-type 7SK are boxed. D. Gelshift analysis of an artificial hairpin RNA (5'HPsyn) carrying the distal and proximal HEXIM-binding motifs of 7SK. Sequences originated from the human 7SK snRNA are boxed.

doi:10.1371/journal.ppat.1001152.g004

with the endogenous HeLa 7SK snRNA (lanes 4, 8 and 12) and the transiently expressed wild-type 5'HP RNA (lane 4), but it showed no association with the mutant 5'HPdm and 5'HPpm RNAs (lanes 8 and 12), indicating that both HEXIM1-binding sites are required for *in vivo* recruitment of HEXIM1.

Next, we assayed the *in vivo* interaction of HA-HEXIM1 with transiently expressed full-length 7SK RNAs which, similarly to the 5'HPdm and 5'HPpm RNAs, carried the pm or dm sequence alterations (Figure 5B). In order to distinguish between the ectopically expressed mutant and the endogenous wild-type 7SK RNAs, RNase A/T1 mappings were performed using antisense probe RNAs specific for the mutant 7SKdm and 7SKpm snRNAs. In contrast to the endogenous 7SK snRNA, the transiently expressed 7SKdm and 7SKpm RNAs failed to efficiently associate with HA-HEXIM1 *in vivo* (lanes 5 and 10). Since docking of HEXIM1 is a prerequisite for P-TEFb binding, neither 7SKdm nor 7SKpm associated with P-TEFb, as demonstrated by co-IPs with HA-tagged CycT1 (lanes 14 and 18). The finding that disruption of either the distal or the proximal HEXIM-binding motif of 7SK abolishes the recruitment of both HEXIM and P-

TEFb demonstrates that under *in vivo* conditions the distal and proximal HEXIM-binding sites of 7SK recruit two copies of HEXIM1 in a tightly interdependent manner.

Tat competes with HEXIM1 for 7SK snRNA binding

Demonstration that HIV Tat binds to the distal HEXIM-binding site of human 7SK snRNA is consistent with the idea that Tat competes with HEXIM for 7SK binding [37]. Indeed, replacement of one copy of HEXIM with Tat would be expected to fully disrupt the 7SK-HEXIM interaction, since *in vivo* recruitment of a HEXIM-dimer requires both HEXIM-binding sites of the 7SK snRNA (Figure 5). To confirm this hypothesis, increasing amounts of Tat-FL was transiently expressed in HeLa cells (Figure 6A). After IP of equal amounts of HEXIM1, co-precipitation of 7SK was monitored by Northern blot analysis followed by PhosphorImager quantification. The ectopically expressed Tat-FL efficiently disrupted the interaction of the endogenous HEXIM1 with 7SK snRNA. Since 7SK and HEXIM can form a stable complex even in the absence of P-TEFb or other components of the 7SK snRNP [26], we assumed that the

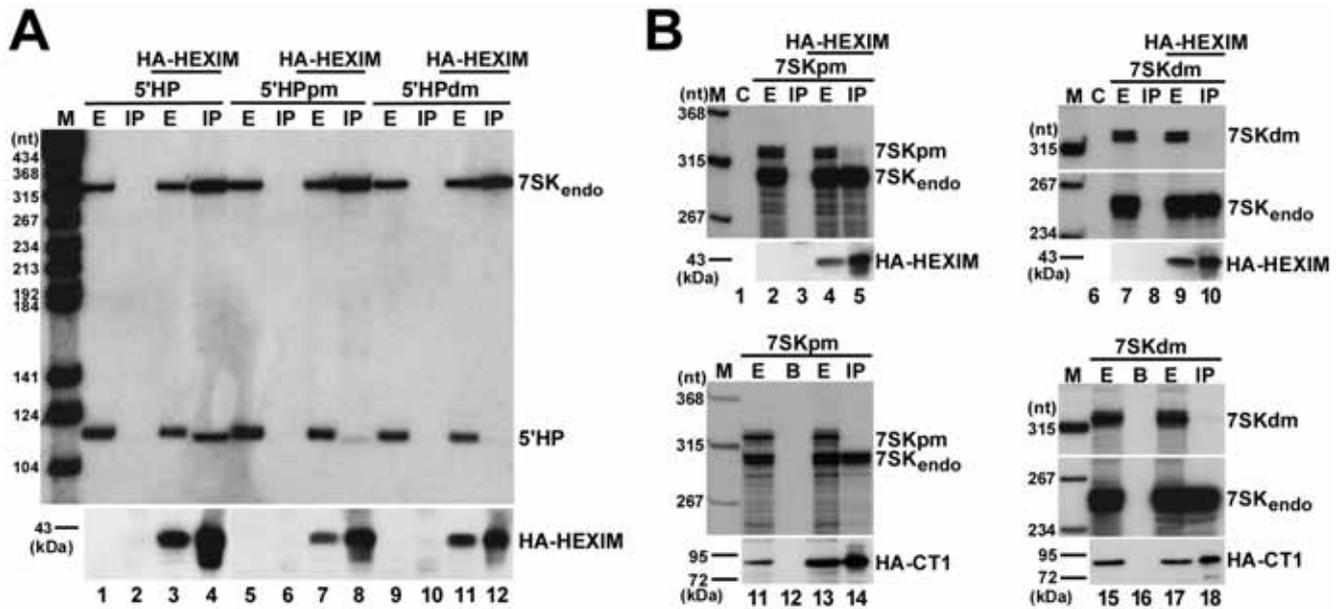


Figure 5. *In vivo* binding of HEXIM1 to 7SK RNA. A. Interaction of HEXIM1 with mutant 7SK 5' hairpin RNAs. HA-HEXIM1 was immunoprecipitated (IP) from extracts (E) prepared from HeLa cells also expressing 5'HP, 5'HPpm or 5'HPdm RNAs. Interaction of HA-HEXIM1 with the endogenous 7SK and the ectopically expressed 5'HP, 5'HPpm, 5'HPdm RNAs was monitored by Northern blot analyses. B. Interaction of HEXIM1 and P-TEFb with mutant 7SK snRNAs. 7SKpm and 7SKdm RNAs were expressed in HeLa cells together with HA-HEXIM1 (lanes 1–10) or in G3H cells accumulating HA-CycT1 (lanes 11–18). After IP, recovery of HA-HEXIM1 and HA-CycT1 was confirmed by Western blot analysis and co-precipitation of the endogenous and ectopically expressed 7SK RNAs was determined by RNase A/T1 mapping. Lane C, control mapping with *E. coli* tRNA. Lane B, control IP with beads alone.
doi:10.1371/journal.ppat.1001152.g005

observed Tat-mediated disruption of the 7SK-HEXIM1 interaction was due to direct competition of Tat and HEXIM1 for 7SK binding. To confirm this conclusion, mutant Tat-FL proteins, Tat-FL(K50Q) and Tat-FL(K50A+K51A) [42], lacking TAR RNA-binding capacity were transiently expressed in HeLa cells (Figure 6B). Co-IP experiments demonstrated that in contrast to the wild-type Tat (lane 2), the mutant Tat proteins failed to bind 7SK snRNA and to disrupt the interaction of HEXIM1 with 7SK and CycT1 (lanes 3 and 4).

The experiments presented thus far demonstrate that the RNA-binding activity of Tat is crucial for disruption of the 7SK/HEXIM/P-TEFb snRNP. However, given that Tat can specifically interact also with CycT1, it remains possible that binding of Tat to the CycT1 subunit of the 7SK/HEXIM/P-TEFb snRNP may also contribute to the disassembly of this particle [38]. To test this possibility, we assayed the 7SK-HEXIM1 interaction in HeLa cells expressing increasing amounts of mutant Tat-FL(C22G) and Tat-FL(K41A) proteins lacking CycT1-binding ability (Figure 6C). Similarly to the wild-type Tat (see Figure 6A), both mutant Tat proteins reduced the association of HeLa 7SK snRNA with HEXIM1 in a concentration-dependent fashion. Next, the mutant Tat-FL(C22G) and Tat-FL(K41A) proteins missing CycT1-binding capacity were transiently expressed in HeLa G3H cells which stably expressed HA-CycT1 [54,55] (Figure 6D). After IP of comparable amounts HA-CycT1, co-precipitation of the endogenous 7SK snRNA and HEXIM1 as well as the ectopically expressed Tat-FL proteins was monitored. As expected, HA-CycT1 interacted with the wild-type Tat-FL, but it failed to bind to the mutant Tat-FL(C22G) and Tat-FL(K41A) proteins. More importantly, expression of the wild-type and mutant Tat proteins largely reduced the association of HA-P-TEFb with 7SK and HEXIM1. We believe that the intact 7SK/HEXIM/P-TEFb (about 25–

35%) that remained in the extracts likely derived from non-transfected cells. Thus, we concluded that Tat can promote the *in vivo* disassembly of 7SK/HEXIM/P-TEFb independently of its CycT1-binding capacity.

The concept that Tat efficiently competes with HEXIM for 7SK binding, implies that Tat and HEXIM bind to the 7SK snRNA in a mutually exclusive manner. To test this, the wild-type and mutant (C22G and K41A) Tat-FL proteins were expressed in HeLa cells (Figure 6E). Co-IP experiments showed that all Tat-FL proteins efficiently associated with HeLa 7SK snRNA but showed no detectable interaction with HEXIM1, demonstrating that Tat and HEXIM interact with 7SK snRNA in a mutually exclusive manner (lanes 4, 6 and 8). As expected, the mutant Tat proteins failed to associate with CycT1 (lanes 6 and 8), but the wild-type Tat-FL interacted with CycT1 (lane 4). Apparently, the wild-type Tat associates with endogenous CycT1 predominantly in a 7SK-independent manner [42,56], but a minor fraction of Tat may also be involved in formation of the recently reported 7SK/Tat/P-TEFb complex [42].

To further confirm that the CycT1-binding activity of Tat is dispensable for disruption of 7SK/HEXIM/P-TEFb, we assayed whether expression of Tat-FL(C22G) and Tat-FL(K41A) could increase the nuclear level of active P-TEFb. The control and mutant Tat-FL proteins were transiently expressed in G3H cells. Upon IP with an anti-HA antibody, the beads with immobilized HA-P-TEFb were incubated with a recombinant GST-CTD protein carrying 48 C-terminal copies of the consensus CTD repeat (YSPTSPS) in the presence of [γ -³²P]ATP (Figure 6D). The phosphorylated GST-CTD was fractionated on a SDS-polyacrylamide gel and the specificity of the phosphorylation reaction was confirmed by Western blotting with an antibody specific for serine 2-phosphorylated CTD. The phosphorylation level of GST-CTD was determined by PhosphorImager quantification. Although

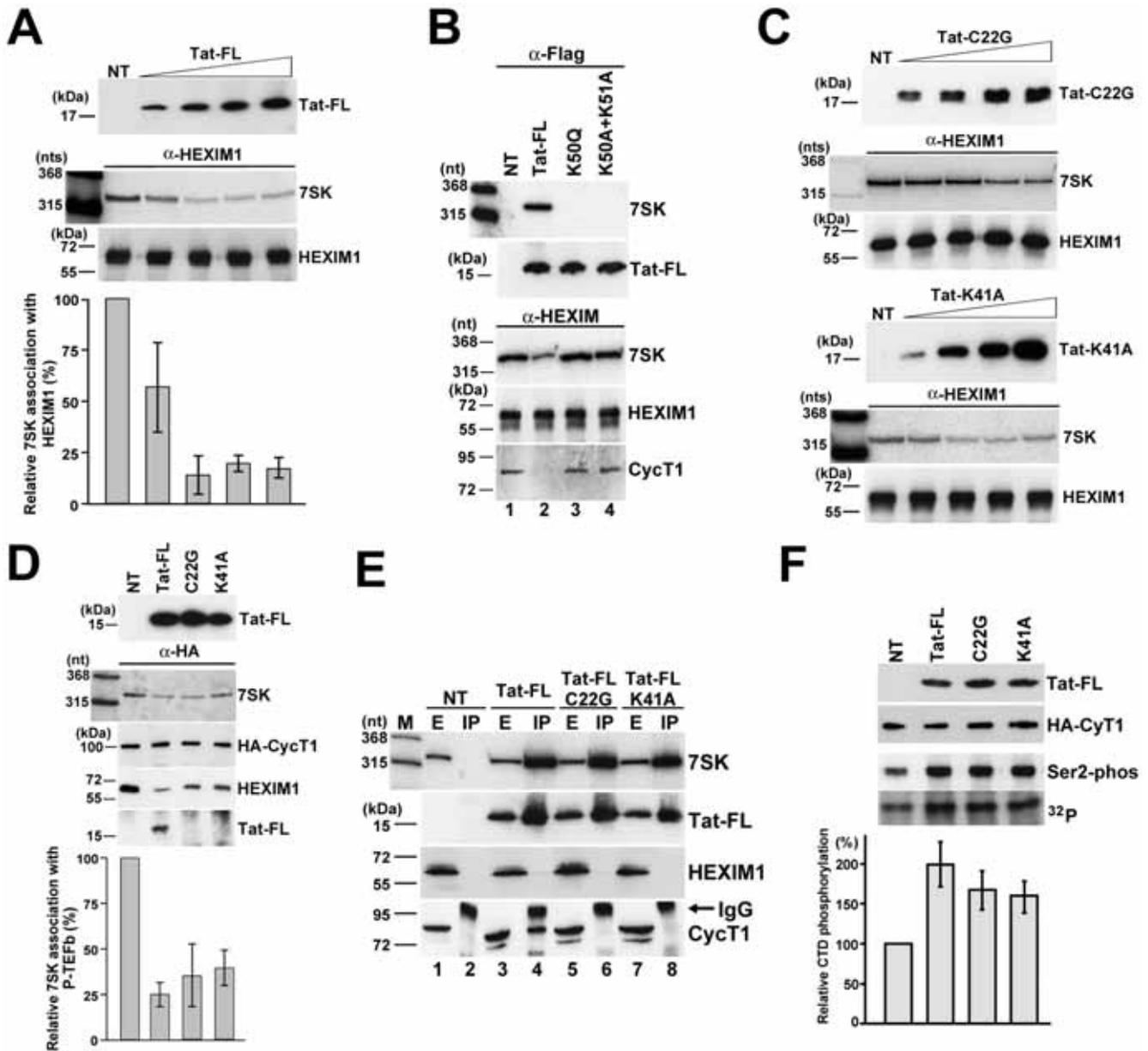


Figure 6. *In vivo* disruption of the 7SK/HEXIM/P-TEFb snRNP by HIV Tat. A. Tat disrupts the interaction of 7SK and HEXIM1. About 5×10^6 HeLa cells were transfected with 0.5, 1.5, 2.5 or 3.5 μ g of pTat-FL. After 48h of incubation, cell extracts were prepared, HEXIM1 was immunoprecipitated and association of 7SK snRNA was measured by Northern blotting. NT, control IP from non-transfected cells. B. The TAR RNA-binding capacity of Tat is essential for 7SK binding and for disruption of the 7SK/HEXIM/P-TEFb snRNP. Transiently expressed wild-type and mutant (K50Q and K50A+K51A) Tat-FL proteins as well as endogenous HEXIM1 were immunoprecipitated and co-purification of endogenous 7SK snRNA and CycT1 was monitored. C. Transiently expressed mutant C22G and K41A Tat proteins lacking CycT1-binding ability can disrupt the *in vivo* interaction of HEXIM1 and 7SK. (For other details, see the captures to panel A) D. Tat disrupts 7SK/HEXIM/P-TEFb independently of its CycT1-binding capacity. Wild-type and mutant (C22G and K41A) Tat-FL proteins were expressed in HeLa G3H cells stably expressing HA-CycT1. Association of HA-CycT1 with 7SK, HEXIM1 and Tat-FL proteins was monitored by co-IP. E. Tat and HEXIM1 bind to 7SK in a mutually exclusive manner. From extracts (E) prepared from HeLa cells non-transfected (NT) or transfected with the pTat-FL, pTat-FL(C22G) or pTat-FL(K41A) expression plasmids the accumulating Tat-FL proteins were immunoprecipitated (IP). Distribution of 7SK snRNA and Tat-FL, HEXIM1 and CycT1 proteins was monitored with RNase A/T1 mapping and Western blot analysis. F. Expression of Tat-FL, Tat-FL(C22G) and Tat-FL(K41A) increases the cellular level of active P-TEFb. From extracts of G3H cells expressing Tat-FL proteins, the HA-tagged P-TEFb was immobilized on beads saturated with anti-HA antibody and incubated with a recombinant GST-CTD protein and $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Distribution of HA-CycT1 and Tat-FL and phosphorylation of GST-CTD at serine 2 were monitored by Western blot analysis. CTD phosphorylation was quantified by PhosphorImager. doi:10.1371/journal.ppat.1001152.g006

comparable amounts of HA-P-TEFb (HA-CycT1) were attached to the beads, the extracts accumulating the wild-type and mutant Tat-FL proteins showed about 1.5 to 2-fold higher CTD phosphorylation activity compared to the non-transfected control

extract. Given that in HeLa cells about 50% of P-TEFb is sequestered into 7SK/HEXIM/P-TEFb, we concluded that expression of the wild-type and mutant Tat proteins efficiently mobilized the nuclear pool of inactive P-TEFb. These results

further corroborated the notion that the CycT1-binding capacity of Tat is not required for the Tat-induced disruption of the 7SK/HEXIM/P-TEFb snRNP and for increasing the nuclear level of active P-TEFb.

Tat does not interact with HeLa 7SK/hnRNP particles

In HeLa cells, a fraction of 7SK snRNA is associated with hnRNP proteins, mainly A1, A2/B1, R and Q [44,57,58]. To exclude the formal possibility that the newly detected 7SK/Tat RNP or at least a fraction of 7SK/Tat derived from the hnRNP-associated pool of 7SK, we tested the effect of Tat expression on HeLa 7SK/hnRNP complexes (Figure 7A). Transient expression of wild-type Tat-FL had no detectable effect on the level of association of hnRNP A1 and A2/B1 with 7SK snRNA (lanes 4 and 6), demonstrating that the hnRNP-associated fraction of 7SK is not available for *in vivo* interaction with HIV Tat.

The hnRNP proteins associate with 7SK snRNA after its stress-induced release from the 7SK/HEXIM/P-TEFb snRNP [44,57,58]. We tested whether after Tat-mediated disruption of 7SK/HEXIM/P-TEFb, the resulting 7SK/Tat snRNP associates with hnRNP proteins (Figure 7B). Transiently expressed Tat-FL, together with 7SK snRNA, was immunoprecipitated and co-purification of hnRNP A1, A2/B1, R, Q and Larp7 was tested by Western blot analysis. Although the 7SK/Tat-FL snRNP interacted with Larp7, none of the tested hnRNP proteins were detected in the pellet, demonstrating that the newly described 7SK/Tat snRNP contains no hnRNP proteins.

Discussion

HIV Tat is an unconventional transcriptional activator that, instead of targeting DNA promoter elements, recruits P-TEFb for HIV transcription through binding to a *cis*-acting RNA enhancer, the TAR RNA. Besides tethering P-TEFb to TAR, Tat also promotes the release of active P-TEFb from the 7SK/HEXIM/P-TEFb negative transcriptional regulatory snRNP [37,38]. In this work, we demonstrate that Tat binds specifically to one of the two HEXIM-binding sites of human 7SK snRNA to displace the HEXIM homodimer on 7SK and to disrupt the 7SK/HEXIM/P-TEFb snRNP.

The 5' hairpin of human 7SK snRNA contains two HEXIM-binding motifs

Although all previous studies agreed that HEXIM binds to the 5' hairpin of 7SK, its precise docking site remained uncertain [26,27,53]. Here, we demonstrated that the 5' hairpin of human 7SK snRNA contains two distinct HEXIM-binding sites which are confined to the A34-C45/G64-A77 distal (DHBS) and the C12-A27/U84-U95 proximal (PHBS) segments (Figure 4). Under *in vitro* conditions, each HEXIM-binding motif of 7SK specifically and independently interacts with one HEXIM molecule.

Both HEXIM-binding sites of the human 7SK snRNA contain a stem-bulge-stem core motif (C37-C45/G64-G70 and G18-A27/U84-C90) which are highly reminiscent of the consensus structure of the minimal Tat-binding element of HIV TAR (Figure 2B and 2C). Consistent with this, HIV Tat and HEXIM proteins carry similar, positively charged, arginine-rich RNA-binding motifs which are essential for interaction with TAR and 7SK RNAs (Figure S1). These observations, together with the finding that Tat binds to the distal HEXIM-binding site of 7SK (Figure 3), strongly suggest that HEXIM and Tat use similar structural and molecular principles to recognize 7SK and TAR RNAs. Along this line of speculation, given that Tat can bind to the HEXIM-binding site of 7SK, it seems to be logical to hypothesize that HEXIM can interact with the Tat-binding site of HIV TAR [38]. However, contrary to our repeated efforts, we failed to detect a specific interaction between HEXIM and TAR (our unpublished data). The lack of TAR-binding ability of HEXIM could be explained by the observations that binding of HEXIM to 7SK snRNA, besides the TAR-like C37-C45/G64-G70 and G18-A27/U84-C90 stem-bulge-stem core motifs, also requires the adjacent A34-C36/C71-A77 and C12-U17/U1-U95 proximal sequences (Figure 4) [26]. Thus, HEXIM seems to form a more intricate interaction with 7SK snRNA than it has been reported for the Tat-TAR complex. The Tat-like RNA-binding motifs of HEXIM proteins are N-terminally extended by highly conserved positively charged regions which may contribute to the specificity of the HEXIM-7SK interaction (Figure S1). Apparently, understanding of the accurate molecular and structural background of the interaction of HEXIM and 7SK snRNA requires further efforts.

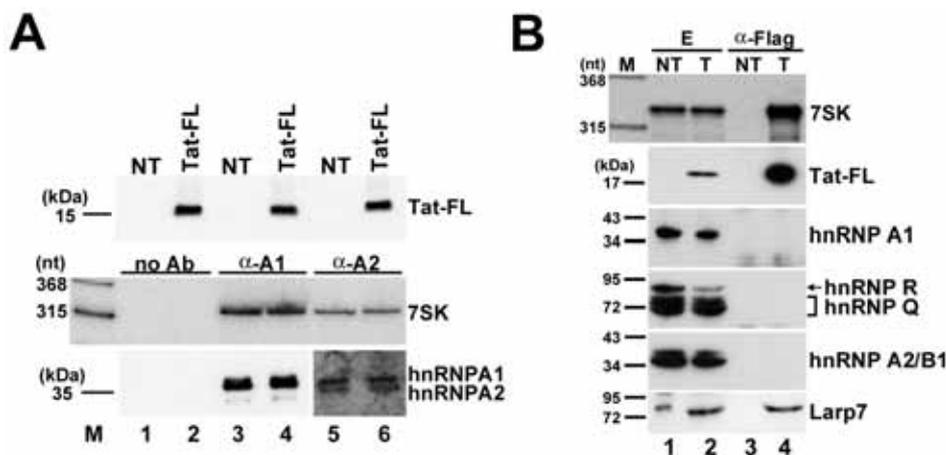


Figure 7. The 7SK/Tat snRNP does not interact with hnRNP proteins. A. Expression of Tat has no effect on the interaction of 7SK and hnRNP proteins. hnRNP A1 and A2/B1 were immunoprecipitated from extracts prepared from HeLa cells expressing or not expressing (NT) Tat-FL. Co-purification of 7SK was assayed by Northern blotting. Lanes no Ab, control IPs without antibody. B. The 7SK/Tat snRNP lacks hnRNP proteins, but associates with Larp7. Transiently expressed Tat-FL was immunoprecipitated from extracts (E) prepared from transfected (T) or non-transfected (NT) HeLa cells. Co-IP of 7SK snRNA and hnRNP and Larp7 proteins was assayed. doi:10.1371/journal.ppat.1001152.g007

The two HEXIM-binding sites of 7SK function in an interdependent manner *in vivo*

A key achievement of the current study is the demonstration that in living cells, assembly of the 7SK/HEXIM/P-TEFb snRNP requires both the distal and proximal HEXIM-binding sites of 7SK, since they recruit a homodimer of HEXIM in a strictly interdependent fashion (Figure 5). Most probably, concerted binding of two HEXIM molecules increases the 7SK-binding affinity of the tethered HEXIM-dimer. For example, structural rearrangements of HEXIM induced by dimerization may promote formation of additional molecular contacts with 7SK snRNA [59]. Interestingly, the 5' hairpins of non-vertebrate 7SK snRNAs seem to carry only one HEXIM-docking site, suggesting that these RNAs interact with one copy of HEXIM and P-TEFb (Figure 2C). Acquisition of a second HEXIM-binding site that occurred probably through sequence duplication at the early stage of vertebrate evolution seems to be advantageous for P-TEFb regulation, since a single 7SK/HEXIM/P-TEFb dissociation event can mobilize two active P-TEFb molecules.

Tat binds to the distal HEXIM-binding motif of human 7SK snRNA

Transiently expressed HIV Tat specifically and efficiently interacts with the endogenous human 7SK snRNA, indicating that the 7SK transcriptional regulatory snRNA is the major RNA target of Tat in the host cell (Figure 1). Tat binds to the evolutionarily conserved C37–C45/G64–G70 internal stem-loop region of the 5' hairpin of human 7SK snRNA (Figure 3). The newly identified Tat-binding motif of 7SK perfectly conforms to the consensus structure of the Tat-binding motif of HIV TAR and it is part of the distal HEXIM-binding site of 7SK.

Most of the available data are consistent with the idea that HIV Tat competes with HEXIM1 for 7SK snRNA binding to promote disassembly of the 7SK/HEXIM/P-TEFb snRNP and to increase the nuclear pool of active P-TEFb. Previous *in vitro* reconstitution experiments showed that Tat could disrupt pre-assembled 7SK/HEXIM/P-TEFb complexes, resulting in stable 7SK/Tat complex and free HEXIM and P-TEFb [38]. Unfortunately, because of the high tendency of recombinant Tat protein for oxidation and aggregate formation [48,60], *in vitro* competition experiments require the usage of a great excess of recombinant Tat, making it difficult to measure and compare the correct *in vitro* 7SK-binding affinities of Tat and HEXIM [38, our unpublished data]. Nevertheless, the *in vivo* competition experiments presented in this study confirmed that Tat efficiently disrupts the association of HEXIM1 and 7SK snRNA upon formation of 7SK/Tat snRNP (Figure 6). Given that both HEXIM-binding sites of 7SK are necessary for *in vivo* recruitment of a HEXIM homodimer, disruption of the 7SK-HEXIM interaction at the distal HEXIM-binding site by docking Tat is expected to release both copies of HEXIM (Figure 5). Providing strong support to this idea, Tat and HEXIM bind to 7SK in a mutually exclusive manner, neither the 7SK/Tat RNP contains HEXIM nor the 7SK/HEXIM complex associates with Tat (Figure 6) [42].

Binding of HEXIM to 7SK is the first and decisive step in the assembly of the 7SK/HEXIM/P-TEFb negative transcriptional regulatory snRNP, because association of HEXIM and P-TEFb is strictly 7SK-dependent [11,27,28]. Free HEXIM cannot bind to CycT1, because its negatively charged CycT1-binding domain forms intramolecular interactions with the adjacent positively charged 7SK-binding motif [28]. Docking 7SK disrupts this autoinhibitory interaction and turns HEXIM into an active conformation ready to bind and inhibit P-TEFb. Thus, disruption

of the interaction of 7SK and HEXIM by Tat is predicted to mobilize the 7SK/HEXIM-associated inactive pool of P-TEFb by triggering its release from HEXIM1. In an alternative model, Tat has been proposed to mediate 7SK/HEXIM/P-TEFb disruption through competing with HEXIM for binding to CycT1 [37]. Arguing against this scenario, amino acid alterations which abolished the interaction of Tat with CycT1 only slightly reduced the ability of the mutant Tat proteins to disrupt 7SK/HEXIM/P-TEFb and to increase P-TEFb activity *in vivo* (Figures 6D and 6F). In contrast, disruption of the 7SK-binding capacity of Tat fully abolished its ability to replace HEXIM1 and to disrupt 7SK/HEXIM/P-TEFb (Figure 6B). Thus, although it remains possible that the CycT1-binding activity of Tat slightly contributes to the Tat-mediated disassembly of 7SK/HEXIM/P-TEFb, our results indicate that the P-TEFb mobilization capacity of Tat depends mostly, if not exclusively, on its 7SK-binding activity.

During revision of the current manuscript, the human 7SK snRNA has been reported to form a stable complex with Tat and P-TEFb [42]. Since 7SK can bind only one molecule of Tat and consequently, one copy of P-TEFb (Figure 3), Tat-induced disruption of 7SK/HEXIM/P-TEFb is expected to release at least half of the associated P-TEFb in the form of free P-TEFb. However, we and others observed that Tat expression converted the nuclear pool of inactive 7SK/HEXIM1/P-TEFb into free, active P-TEFb with a very high (75–95%) efficiency, suggesting that the newly described 7SK/Tat/P-TEFb accumulates at low levels (Figure 6D) [37,38]. Nevertheless, the functional significance of the novel 7SK/Tat/P-TEFb RNP played in HIV expression remains to be established.

Demonstration that the distal HEXIM-binding site of the human 7SK snRNA encompasses a perfect Tat-binding motif has an important biomedical impact. Targeting the Tat-binding site of HIV TAR RNA with small-molecule drugs to block Tat-mediated transactivation is a very attractive approach for anti-viral therapy [61]. However, potential anti-HIV drugs with strong TAR-binding capacity are expected to interact also with the distal HEXIM-binding motif of 7SK and therefore, to promote the disassembly of 7SK/HEXIM/P-TEFb that shifts the P-TEFb equilibrium toward the active form. Since increased P-TEFb activity may have deleterious effects [16,62], therapeutic targeting of HIV TAR requires the design of ligands which are highly specific for the TAR RNA. So, our results suggest that drug-mediated therapeutic inhibition of Tat-TAR interaction requires more precautions than anticipated before.

Materials and Methods

General procedures

Unless stated otherwise, all techniques used for manipulation of DNA, RNA oligonucleotides and proteins were performed according to standard laboratory procedures. The identity of all plasmid constructs was verified by sequence analysis. Human HeLa and G3H cells, the latter was provided by Dr Q. Zhou [63], were grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen). Expression plasmids were introduced into HeLa and G3H cells by using the FuGENE transfection reagent (Roche).

Plasmid construction

Construction of the p7SK, p5'HP and pHA-HEXIM1 expression plasmids has been described [26]. The pTat-FL, pTat-FL(C22G), pTat-FL(K41A), pTat-FL(K50Q) and pTat-FL(K50A+K51A) plasmids have been provided by Dr M. Benkirane [42,64]. The p7SKdm, p7SKpm, p5'HPdm, p5'HPpm, p5'HPpm+dm, p5'HP(U40–U41),

p5'HP(U72-C75), p5'HP(U68-G70), p5'HP(G64-U68), p5'HP(U40), p5'HP(A43) and p5'HP(G42-A43) 7SK expression plasmids were generated by PCR-mediated mutagenesis using p7SK and p5'HP as templates.

RNA analysis

RNA isolation from HeLa and G3H cells and cell extracts has been described [26]. RNAs co-immunoprecipitated with Tat-FL were 3' end-labeled with [5'-³²P]pCp and T4 RNA ligase before fractionation on a 6% sequencing gel. After elution from the gel, the labeled 7SK snRNA was partially digested with RNase T1 in 25 mM Na-citrate, pH 5.0, and 7 M urea at 55°C. Partial RNA hydrolysis was performed in deionized formamide containing 0.4 mM MgCl₂ at 100°C. For Northern blot analysis, RNAs were size-fractionated on a 6% denaturing gel and electroblotted onto a Hybond-N nylon membrane (Amersham Biosciences). The filters were probed with labeled oligonucleotides complementary to the human 7SK snRNA from U92 to G111, from G272 to C291 or from C48 to C67. To generate sequence-specific antisense RNA probes for mapping of 7SK, 7SKpm, and 7SKdm RNAs, the corresponding expression plasmids were linearized with *Pst*I and used as templates for *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase. RNase A/T1 protection analysis has been described [26].

Complex formation and bandshift assays

To generate template DNAs for *in vitro* synthesis of internally ³²P-labeled 5'HP, Dist, 5'HPdm, 5'HPpm and 5'HPdm+pm probe RNAs, the corresponding fragments of the p5'HP, p5'HPdm, p5'HPpm and p5'HPdm+pm plasmids were amplified with appropriate oligonucleotides which also incorporated the T7 promoter. Template DNAs for synthesis of Prox, DHBS, PHBS and 5'HPsyn were obtained by annealing of appropriate synthetic oligonucleotides followed by cloning into the pBluescribe plasmid. Recombinant HEXIM1 was purified as described [26]. Tat(38–72) peptide was synthesized by PolyPeptide Group [51]. RNA-protein complexes were formed in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 14.4 mM 2-mercaptoethanol in the presence of 20 ng/μl of *E. Coli* tRNA at RT. The complexes were analyzed

on 4% or 5% polyacrylamide gels (29:1 acrylamide:*bis*-acrylamide) containing 2.5% glycerol in 0.5× TBE.

In vitro CTD phosphorylation

Human G3H cells transiently expressing wild-type or mutant (C22G and K41A) Tat-FL proteins were lysed in buffer A (20 mM HEPES, pH 7.9, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 0.05% Nonidet P40) supplemented with 10 U/ml of RNasin (Promega) and protease inhibitor cocktail (Roche). After centrifugation at 10,000× g for 10 min, the extracts were incubated with anti-HA-agarose beads (Sigma) for 1 hour. The beads were washed five times in buffer A, resuspended in 100 μl of buffer A and incubated with 2 μg of recombinant GST-CTD containing 48 consensus CTD repeats (YSPTSPS) and 10 μCi of [γ -³²P]ATP (6000 Ci/mmol) at 30°C. Phosphorylation of GST-CTD was measured by PhosphorImager quantification after fractionation on 8% SDS/polyacrylamide gel.

Supporting Information

Figure S1 Comparison of the positively charged RNA-binding motifs of HIV Tat and HEXIM proteins. HIV Tat (AAC29057), human (NM_006460; NM_144608), *Xenopus laevis* (NP_001090038), *Salmo salar* (NP_001133431), *Danio rerio* (NP_001091859), *Ciona intestinalis* (XP_002128947), *Ixodes scapularis* (XP_002408010), *Strongylocentrotus purpuratus* (XP_792438) and *Nematostella vectensis* (XP_001636835) HEXIM proteins were obtained from the GenBank. The regions conserved in Tat and HEXIM proteins are boxed. Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1001152.s001 (0.17 MB TIF)

Acknowledgments

We are grateful to Drs M. Benkirane, Q. Zhou and S. Murphy for providing us with expression vectors, cell lines and reagents, respectively.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LM SE BU BEJ TK. Analyzed the data: LM SE BU BEJ TK. Wrote the paper: TK.

References

- Peterlin BM, Price DH (2006) Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* 23: 297–305.
- Nechaev S, Adelman K (2008) Promoter-proximal Pol II: when stalling speeds things up. *Cell Cycle* 7: 1539–1544.
- Price DH (2008) Poised polymerases: on your mark...get set...go! *Mol Cell* 30: 7–10.
- Core LJ, Lis JT (2008) Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science* 319: 1791–1792.
- Wade JT, Struhl K (2008) The transition from transcriptional initiation to elongation. *Curr Opin Genet Dev* 18: 130–136.
- Chao S-H, Price DH (2001) Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription *in vivo*. *J Biol Chem* 276: 31793–31799.
- Zhu Y, Peery T, Peng J, Ramanathan Y, Marshall NF, et al. (1997) Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation *in vitro*. *Genes Dev* 11: 2622–2632.
- Nguyen VT, Kiss T, Michels AA, Bensaude O (2001) 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* 414: 322–325.
- Yang Z, Zhu Q, Luo K, Zhou Q (2001) The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature* 414: 317–322.
- Michels AA, Nguyen VT, Fraldi A, Labas V, Edwards M, et al. (2003) MAQ1 and 7SK RNA interact with CDK9/cyclin T complexes in a transcription-dependent manner. *Mol Cell Biol* 23: 4859–4869.
- Yik JH, Chen R, Nishimura R, Jennings JL, Link AJ, et al. (2003) Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol Cell* 12: 971–982.
- Byers SA, Price JP, Cooper JJ, Li Q, Price DH (2005) HEXIM2, a HEXIM1 related protein, regulates P-TEFb through association with 7SK. *J Biol Chem* 280: 16360–16367.
- Yik JH, Chen R, Pezda AC, Zhou Q (2005) Compensatory contributions of HEXIM1 and HEXIM2 in maintaining the balance of active and inactive P-TEFb complexes for control of transcription. *J Biol Chem* 280: 16368–16376.
- Markert A, Grimm M, Martinez J, Wiesner J, Meyerhans A, et al. (2008) The La-related protein LARP7 is a component of the 7SK ribonucleoprotein and affects transcription of cellular and viral polymerase II genes. *EMBO Reports* 9: 569–575.
- Krueger BJ, Jeronimo C, Roy BB, Bouchard A, Barrandon C, et al. (2008) LARP7 is a stable component of the 7SK snRNP while P-TEFb, HEXIM1 and hnRNP A1 are reversibly associated. *Nucleic Acids Res* 36: 2219–2229.
- He N, Jahchan NS, Hong E, Li Q, Bayfield MA, et al. (2008) A La-related protein modulates 7SK snRNP integrity to suppress P-TEFb-dependent transcriptional elongation and tumorigenesis. *Mol Cell* 29: 588–599.
- Jeronimo C, Forget D, Bouchard A, Li Q, Chua G, et al. (2007) Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol Cell* 27: 262–274.
- Barboric M, Lenasi T, Chen H, Johansen EB, Guo S, et al. (2009) 7SK snRNP/P-TEFb couples transcription elongation with alternative splicing and is essential for vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7798–7803.
- He N, Pezda AC, Zhou Q (2006) Modulation of a P-TEFb functional equilibrium for the global control of cell growth and differentiation. *Mol Cell Biol* 26: 7068–7076.
- Contreras X, Barboric M, Lenasi T, Peterlin BM (2007) HMBA releases P-TEFb from HEXIM1 and 7SK snRNA via PI3K/Akt and activates HIV transcription. *PLoS Pathogens* 3: 1459–1469.
- Sano M, Abdellatif M, Oh H, Xie M, Bagella L, et al. (2002) Activation and function of cyclin T-Cdk9 (positive transcription elongation factor-b) in cardiac muscle-cell hypertrophy. *Nat Med* 8: 1310–1317.

-RESULTATS-

Chapitre I : Mécanisme utilisé par la protéine Tat du VIH-1 pour libérer P-TEFb de la snRNP 7SK

IV) Conclusion

Nos analyses ont confirmé l'existence d'une interaction spécifique entre la protéine Tat du VIH-1 et le snARN 7SK humain *in vivo*. Un élément localisé dans la partie distale de la tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK est nécessaire pour la liaison directe de la protéine Tat au snARN 7SK. La protéine Tat se lie au motif C37-C45/G64-G70 du snARN 7SK, conservé au cours de l'évolution, qui est très similaire, d'un point de vue structural, au motif de liaison de Tat sur l'ARN TAR du VIH-1.

Or, le motif de liaison à l'ARN TAR de la protéine Tat du VIH-1 présente une très forte homologie avec la partie amino-terminale du motif de liaison au snARN 7SK des protéines HEXIM de plusieurs espèces phylogénétiquement distantes (Yik et al., 2004). Cela suggère que Tat et HEXIM pourraient se lier à un motif similaire au sein de la tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK. Nos analyses menées en retard sur gel ont montré que la structure en tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK contient deux sites de liaison pour les protéines HEXIM. Au sein de cette tige-boucle, les éléments A34-C45/G64-A77 et C12-A27/U84-U95 forment les motifs minimaux nécessaires pour la liaison d'HEXIM *in vitro*. L'analyse mutationnelle, dans des cellules en culture, des motifs du snARN 7SK impliqués dans l'interaction avec HEXIM a permis de montrer que, *in vivo*, ces deux sites de liaison d'HEXIM recrutent deux copies d'HEXIM de manière interdépendante. Par ailleurs, le site de liaison de Tat sur le snARN 7SK est inclus dans l'un des deux sites de liaison d'HEXIM identifiés. Cela suggère une compétition entre les protéines Tat et HEXIM pour la liaison au snARN 7SK. L'existence d'une telle compétition a été mise en évidence par des analyses de l'interaction entre HEXIM et le snARN 7SK dans des cellules en culture dans lesquelles des quantités croissantes de protéine Tat ont été transitoirement exprimées. L'expression de Tat entraîne un désassemblage du complexe entre HEXIM et le snARN 7SK, qui provoque une augmentation du niveau de P-TEFb libre actif dans la cellule. Afin de définir les interactions mises en jeu par la protéine Tat du VIH-1 pour désassembler la snRNP 7SK, le même type d'expérience a été réalisé en utilisant des mutants de la protéine Tat ayant perdu leur capacité de liaison à la CycT1 ou ayant perdu leur capacité de liaison à l'ARN TAR. Ces analyses ont permis de montrer que la capacité de liaison à la CycT1 de Tat n'est pas essentielle au désassemblage de la snRNP 7SK, contrairement à sa capacité de liaison à l'ARN.

Nos analyses de co-immunopécipitation ont montré que la protéine Tat du VIH-1 n'interagit pas avec le complexe snARN 7SK/hnRNP. De plus, l'expression de Tat dans des cellules en culture n'a pas d'effet détectable sur l'association du snARN 7SK avec les protéines hnRNP.

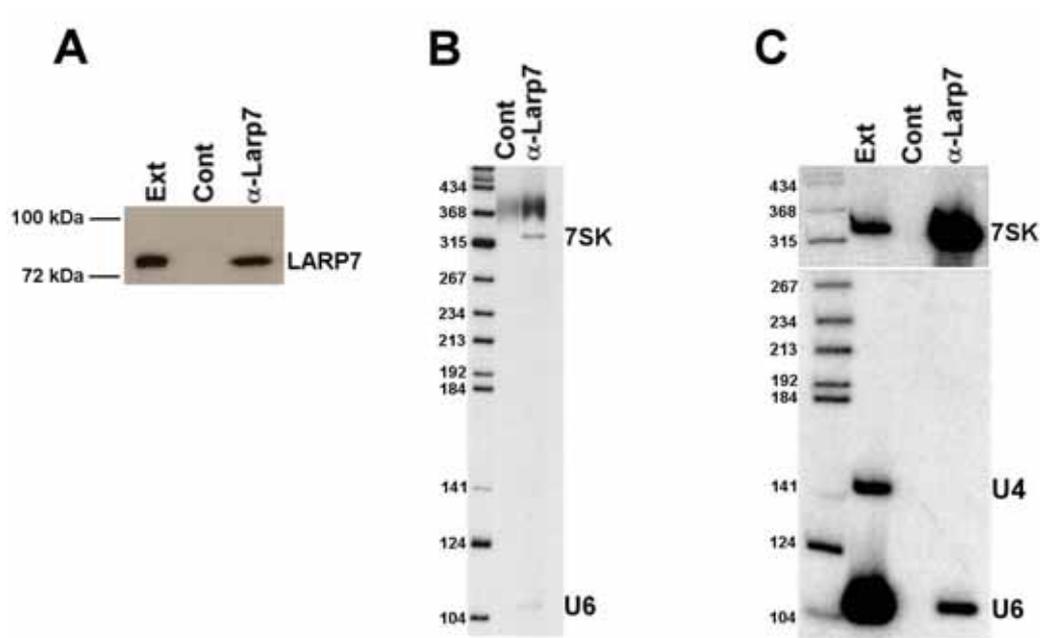


Figure 1 : Association de la protéine LARP7 avec les snARN 7SK et U6 *in vivo*

Des extraits de cellules HeLa ont été incubés avec des billes d'agarose-protéine A saturées (α -LARP7) ou non (cont) avec un anticorps anti-LARP7 (Euromedex, ARP40847_P050). A) La précipitation de LARP7 est visualisée par Western blot. B) Les ARN co-précipités avec LARP7 ont été radio-marqués *in vitro* à leur extrémité 3', séparés sur un gel dénaturant et visualisés par autoradiographie. C) L'identité des ARN co-précipités avec LARP7 a été confirmée par une analyse en Northern blot.

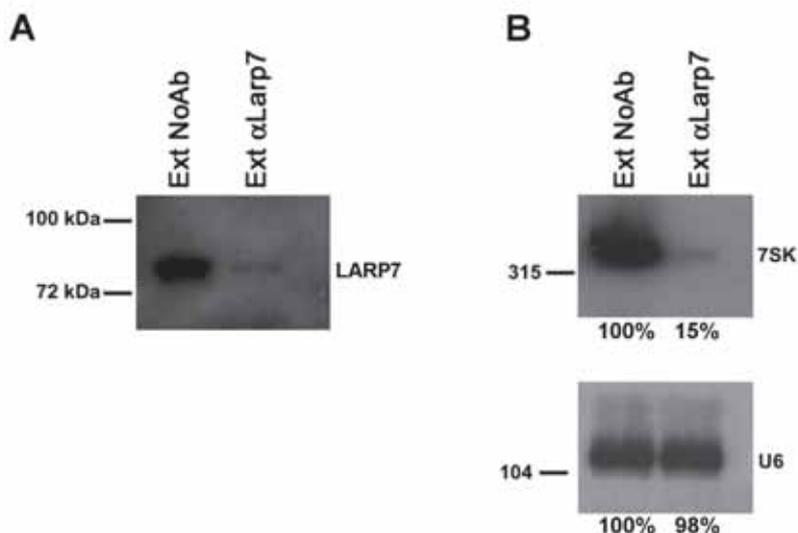


Figure 2 : La protéine LARP7 s'associe avec la quasi totalité des molécules de snARN 7SK *in vivo*

A) Analyse en Western blot de la protéine LARP7 endogène restant dans des extraits de cellules HeLa après une incubation avec des bille d'agarose-protéine A saturées (Ext α -LARP7) ou non (Ext NoAb) avec un anticorps anti-LARP7. B) Analyse en Northern blot des snARN 7SK et U6 endogènes restant dans des extraits de cellules HeLa après l'immuno-déplétion de la protéine LARP7 endogène.

Chapitre II : Analyse structurale des sites de liaison des protéines LARP7 et MePCE au snARN 7SK

I) Etat du domaine

La snRNP 7SK séquestrant le facteur P-TEFb contient le snARN 7SK, et les protéines nucléaires, HEXIM, LARP7 et MePCE. Au sein de ce complexe, le snARN 7SK, un abondant transcrit de 331 nucléotides produit par l'ARN pol III et très conservé chez les vertébrés, fonctionne comme un échafaudage moléculaire pour coordonner les interactions entre les différents composants protéiques clés (Zhou and Yik, 2006). Tandis qu'HEXIM inhibe l'activité kinase de CDK9 de manière dépendante du snARN 7SK (Michels et al., 2004; Yik et al., 2003), LARP7 et MePCE assurent la stabilité du snARN 7SK (He et al., 2008; Jeronimo et al., 2007; Krueger et al., 2008). LARP7 est une protéine qui se lie à l'extrémité 3'-UUU-OH du snARN 7SK et la protège contre la dégradation par des exonucléases (He et al., 2008; Krueger et al., 2008; Markert et al., 2008). Dans les cellules, la quasi totalité des molécules de snARN 7SK sont liées par LARP7, ce qui explique que la diminution de la quantité de LARP7 par ARNi cause une co-dépletion quasi complète du snARN 7SK (He et al., 2008; Krueger et al., 2008; Markert et al., 2008). MePCE, quant à elle, contient un domaine méthyltransférase et est responsable de l'ajout d'une coiffe γ -monométhyl phosphate à l'extrémité 5' du snARN 7SK (Jeronimo et al., 2007). Le snARN 7SK semble coiffé de manière co-transcriptionnelle, avant son association au sein d'une snRNP 7SK. Lors de son interaction avec LARP7 au sein de la snRNP 7SK, l'activité de MePCE est inhibée, probablement à cause de l'occlusion de son site catalytique par LARP7 (Xue et al., 2010). Malgré son absence d'activité catalytique au sein de la snRNP 7SK, MePCE présente une autre fonction en favorisant l'interaction entre LARP7 et le snARN 7SK, ce qui stabilise le snARN 7SK et facilite l'assemblage du sous-complexe stable MePCE-LARP7-7SK (Xue et al., 2010). Ainsi, la diminution de la quantité de MePCE dans les cellules par ARNi entraîne une réduction des niveaux de snARN 7SK de 50% (Jeronimo et al., 2007; Xue et al., 2010). MePCE et LARP7 agissent donc coopérativement pour stabiliser le snARN 7SK et maintenir l'intégrité des snRNP 7SK.

II) Question posée et démarche expérimentale

Malgré leur importance capitale pour le maintien de la stabilité du snARN 7SK et donc pour le maintien d'un équilibre fonctionnel entre les formes active et inactive de P-TEFb, on dispose de très peu d'informations concernant la liaison de LARP7 et MePCE au snARN 7SK. Il a, par exemple, été montré que LARP7 se lie à l'extrémité 3'-UUU-OH du snARN 7SK. Or, de nombreux autres ARN synthétisés par l'ARN pol III possèdent également ce type d'extrémité 3'. Ainsi, plusieurs études ont montré que LARP7 se lie également au snARN U6, qui est lui aussi synthétisé par l'ARN pol III et possède donc également une extrémité 3'-UUU-OH. Une question se pose alors, LARP7 se lie-t-elle spécifiquement au snARN 7SK ou se lie-t-elle tout simplement à tous les ARN possédant une extrémité 3'-UUU-OH ? Et, si LARP7 ne se lie pas à tous les ARN ayant une extrémité 3'-UUU-OH, quels sont les éléments du snARN 7SK déterminant la spécificité de liaison de LARP7 ?

Quant à MePCE, il a été montré que cette protéine se lie aux snARN 7SK et U6. Néanmoins, on ne sait pas si MePCE se lie à d'autres ARN dans les cellules et donc si cette interaction avec les snARN U6 et 7SK est spécifique. Et si tel est le cas, quel sont les éléments déterminant la spécificité de liaison de MePCE au snARN 7SK ?

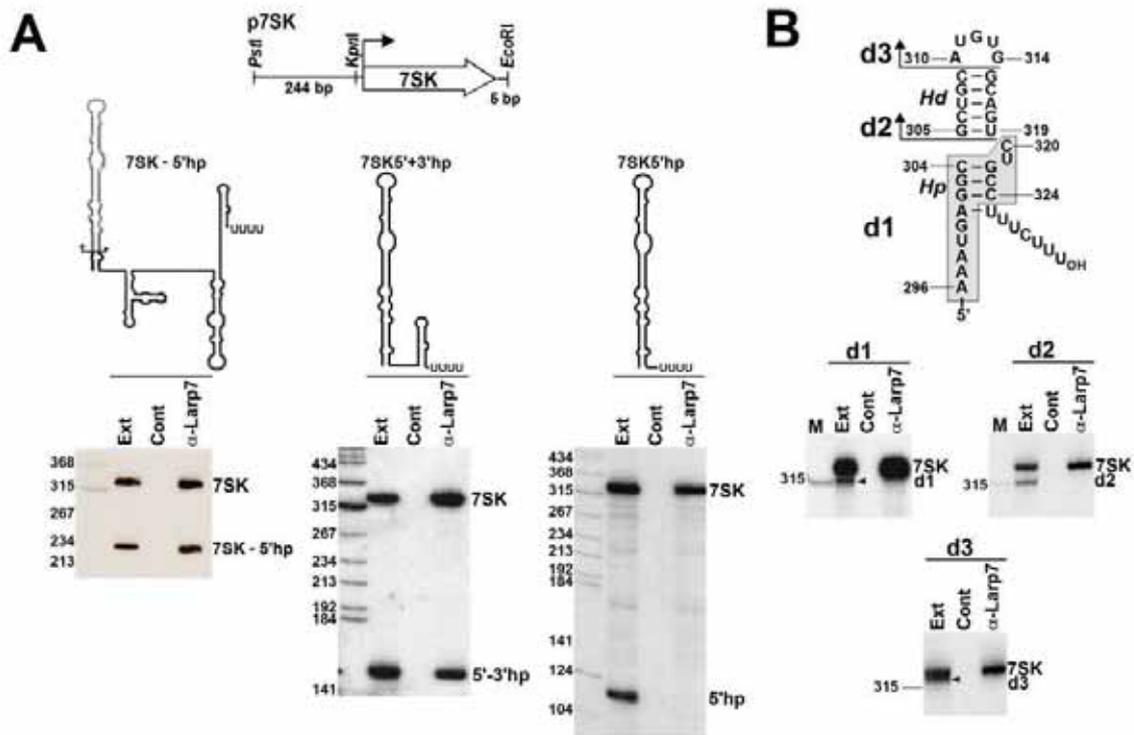


Figure 3 : La tige-boucle 3' du snARN 7SK contient des éléments essentiels pour la liaison de LARP7 *in vivo*

A) La structure schématique du vecteur d'expression p7SK et les structures secondaires prédites des différents snARN 7SK tronqués sont représentées. Les snARN 7SK tronqués ont été exprimés transitoirement dans des cellules HeLa. La protéine LARP7 a été immunoprécipitée à partir des cellules HeLa transfectées. Les snARN 7SK endogène (7SK) et mutants co-précipités avec LARP7 ont été analysés par Northern blot. B) La structure secondaire prédite de la tige-boucle située à l'extrémité 3' du snARN 7SK est représentée. Les différentes délétions introduites dans cette structure sont indiquées par des flèches ou une boîte grisée. Les snARN 7SK portant des délétions dans la tige-boucle 3' ont été exprimés transitoirement dans des cellules HeLa. L'interaction de la protéine LARP7 endogène avec ces snARN 7SK mutants a été analysée par co-immunoprécipitations avec un anticorps anti-LARP7 suivies d'analyses par Northern blot.

-RESULTATS-

Chapitre II : Analyse structurale des sites de liaison des protéines LARP7 et MePCE au snARN 7SK

Afin de déterminer avec quels ARN au sein des cellules interagissent LARP7 et MePCE, nous avons, dans un premier temps, réalisé une immunoprécipitation de chacune de ces deux protéines, puis extrait les ARN co-précipités qui ont ensuite été analysés par marquage au pCp. Pour définir les éléments du snARN 7SK nécessaires pour l'interaction avec LARP7 et MePCE, nous avons entrepris une analyse mutationnelle du snARN 7SK. Par des expériences de co-immunoprécipitation, nous avons testé la capacité de liaison à LARP7 et MePCE d'une batterie de snARN 7SK mutants portant différentes délétions ou mutations.

III) Résultats

La protéine LARP7 se lie spécifiquement au snARN 7SK *in vivo*

Pour déterminer si la protéine LARP7 interagit spécifiquement avec le snARN 7SK ou si elle peut également interagir avec d'autres ARN, nous avons immunoprécipité la protéine LARP7 endogène avec un anticorps anti-LARP7 dans des cellules HeLa en culture. Comme démontré par l'analyse en Western blot, la protéine LARP7 endogène est efficacement précipitée (figure 1A). Après avoir été radiomarqués à leur extrémité 3', les ARN co-précipités avec LARP7 ont été analysés sur un gel dénaturant (figure 1B). L'autoradiographie a révélé que LARP7 se lie spécifiquement à deux ARN ayant une mobilité électrophorétique correspondant aux snARN U6 et 7SK humains. Pour confirmer l'identité de ces deux ARN, nous avons réalisé des analyses en Northern blot en utilisant des oligonucléotides spécifiques des snARN 7SK et U6 (figure 1C). Ces analyses ont confirmé l'identité des ARN spécifiquement co-précipités dans les cellules HeLa avec LARP7 comme étant les snARN U6 et 7SK.

Il a été montré que LARP7 se lie avec la quasi totalité des molécules de snARN 7SK dans les cellules (He et al., 2008; Krueger et al., 2008), mais aucune donnée n'est disponible concernant l'interaction de LARP7 avec le snARN U6. Or, il a été montré que la diminution des niveaux de LARP7 dans les cellules par ARNi entraîne une co-déplétion du snARN 7SK mais n'affecte pas les niveaux de snARN U6 (Krueger et al., 2008). Pour déterminer le pourcentage de ces deux snARN associés à LARP7 dans des cellules HeLa, nous avons immuno-déplété la protéine LARP7 endogène à partir d'extraits cellulaires. L'efficacité de cette déplétion est illustrée par la quantité de LARP7 restant dans les extraits cellulaires après immuno-déplétion (figure 2A). Confirmant les résultats obtenus par d'autres, cette immuno-déplétion de LARP7 cause une co-déplétion quasi complète du snARN 7SK, suggérant que LARP7 interagit avec la quasi totalité des molécules de snARN 7SK cellulaires. Néanmoins, l'immuno-déplétion de LARP7 n'a pas d'effet significatif sur la quantité de snARN U6 restant dans les extraits cellulaires (figure 2B), suggérant que LARP7 interagit avec un très faible pourcentage des molécules de snARN U6 dans les cellules.

Plusieurs éléments sont requis pour la liaison de LARP7 au snARN 7SK

Comme LARP7 se lie spécifiquement au snARN 7SK et non à tous les ARN possédant une extrémité 3'-UUU-OH, il est probable que cette extrémité 3' particulière ne soit pas le seul déterminant de l'interaction de LARP7 avec le snARN 7SK. Pour définir les éléments structuraux du snARN 7SK humain nécessaires à la liaison de LARP7, une série de mutants du snARN 7SK portant des délétions ont été exprimés transitoirement dans des cellules HeLa. La capacité de liaison à LARP7 de chacun de ces ARN exprimés de manière ectopique a été déterminée par co-immunoprécipitation avec la protéine LARP7 endogène, en utilisant l'anticorps anti-LARP7, suivie par une analyse par Northern blot (figure 3A). La co-précipitation du snARN 7SK endogène avec LARP7 apporte un contrôle positif pour chaque réaction d'immuno-précipitation. La délétion de la tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK (7SK-5'hp), à l'exception des cinq premiers nucléotides de l'ARN (G1 à G5) qui

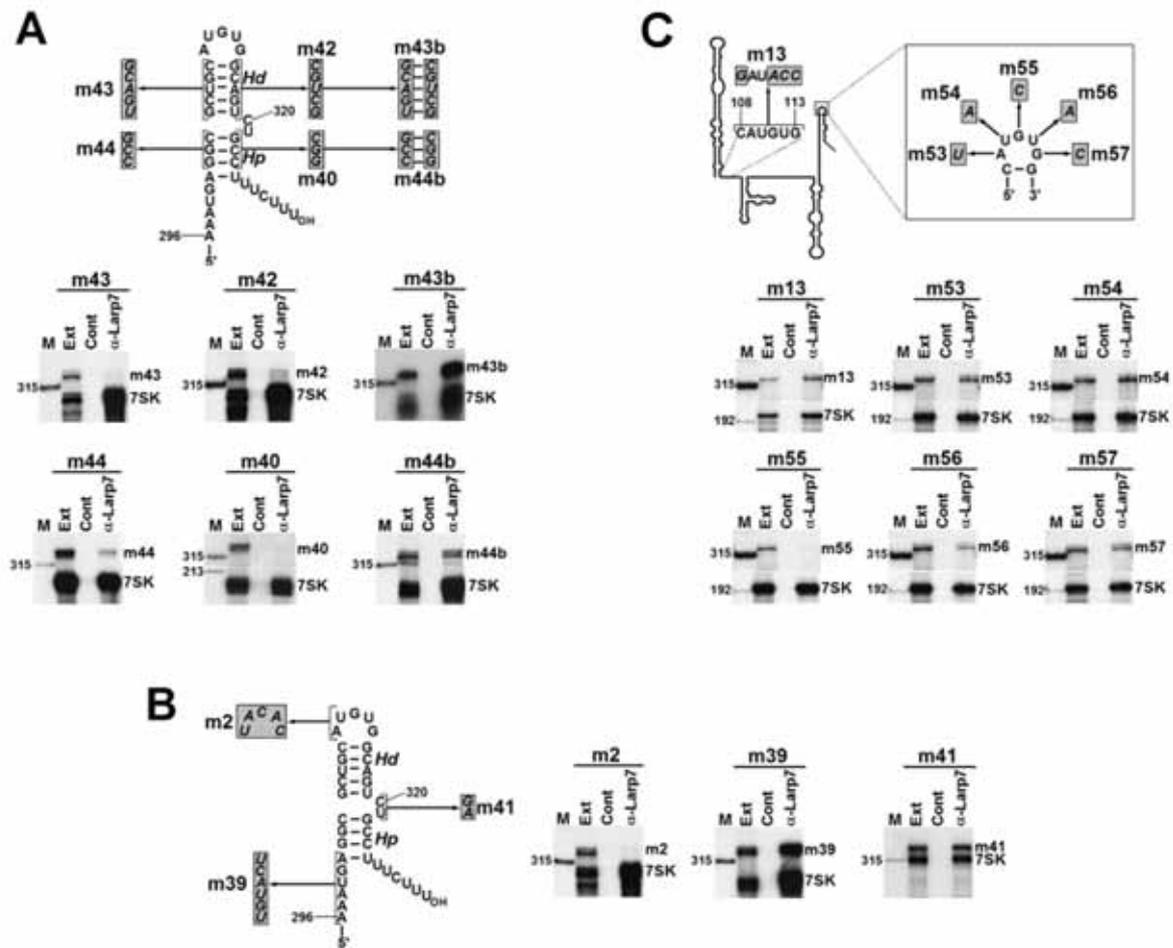


Figure 4 : La structure secondaire et la boucle apicale de la structure en tige-boucle située à l'extrémité 3' du snARN 7SK sont essentielles pour la liaison de la protéine LARP7 *in vivo*

A), B) et C) Les altérations de séquences introduites au sein de la tige-boucle 3' du snARN 7SK sont indiquées sur une représentation schématique de la structure secondaire prédite de cette région du snARN 7SK. Les régions prédites comme étant appariées (Hp et Hd) sont indiquées. L'interaction des mutants du snARN 7SK, exprimés transitoirement dans des cellules HeLa, avec la protéine LARP7 endogène a été analysée par co-immunoprécipitation avec un anticorps anti-LARP7. Les snARN 7SK mutants et endogène co-précipitées avec LARP7 ont été détectés par protection à la RNase A/T1 avec des sondes antisens spécifiques de chaque mutant du snARN 7SK.

-RESULTATS-

Chapitre II : Analyse structurale des sites de liaison des protéines LARP7 et MePCE au snARN 7SK

pourraient influencer l'initiation de la transcription, n'a pas d'effet sur son association avec LARP7. De même, la délétion de toute la région centrale U116-C295 du snARN 7SK formant l'ARN minimal 7SK5'+3'hp, constitué uniquement des tige-boucles situées aux extrémités 5' et 3' du snARN 7SK, n'abolit pas son association avec LARP7. En revanche, l'ARN minimal 7SK5'hp, constitué uniquement de la tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK et de la série de U constituant le signal de terminaison de la transcription par l'ARN pol III, ne s'associe pas avec LARP7. Il semble donc que ni la tige-boucle située à l'extrémité 5', ni la région centrale du snARN 7SK ne contiennent d'élément essentiel pour la liaison de LARP7. Par contre, la tige-boucle située à l'extrémité 3' du snARN 7SK semble comporter des éléments nécessaires pour la liaison de LARP7.

Afin de définir les éléments nécessaires pour la liaison de LARP7 à la tige-boucle 3' du snARN 7SK, nous avons réalisé une analyse mutationnelle détaillée de cette région. La délétion des régions proximale (d1) ou distale (d2) de la tige-boucle 3', ou l'élimination de sa boucle apicale (d3), abolit la capacité de liaison à LARP7 des trois mutants 7SK-d1, 7SK-d2, et 7SK-d3 (figure 3B). De la même façon, la destruction des tiges proximale (Hp) (m44 et m40) ou distale (Hd) (m43 et m42), en substituant l'une des séquences appariées par une séquence non complémentaire, abolit la liaison de LARP7 (figure 4A). Nous avons ensuite restauré les tiges Hp (m44b) et Hd (m43b) en substituant les séquences des régions appariées par leur séquence complémentaire (figure 4A). La restauration des tiges rétablit la capacité de liaison à LARP7 de ces mutants. Cela suggère que même si leur séquence en nucléotides n'est pas un élément critique, les tiges Hp et Hd jouent un rôle essentiel dans la liaison de LARP7. La mutation par substitution des nucléotides A296 à A301 (m39), qui semblent relativement variables au cours de l'évolution comparativement au reste de la tige-boucle 3' (Egloff et al., 2006), ou, des nucléotides C320 et U321 de la boucle latérale (m41) n'affecte pas la liaison de LARP7 (figure 4B). Cela suggère que la composition en nucléotides de ces éléments n'est pas essentielle pour la liaison de LARP7. Par contre, la mutation par substitution des cinq nucléotides constituant la boucle apicale de la tige-boucle 3' du snARN 7SK (m2) abolit la liaison de LARP7 (figure 4B). Au sein de cette boucle apicale, la mutation des nucléotides A310 (m53), U311 (m54) ou G314 (m57) n'altère pas la liaison de LARP7. En revanche, la mutation des nucléotides G312 (m55) ou U313 (m56) affecte considérablement sa liaison (figure 4C). Cela indique que les nucléotides G312 et U313 jouent un rôle important pour la liaison de LARP7.

Ces résultats démontrent qu'en plus de l'extrémité 3'-UUU-OH, la région G302 à C324 de la tige-boucle située à l'extrémité 3' du snARN 7SK est essentielle pour la liaison de LARP7. La structure secondaire de cette région de même que la séquence de la boucle apicale semblent essentielles pour la liaison de LARP7. En tenant compte de ces éléments, si l'on considère la délétion introduite dans le mutant 7SK-d1 (figure 3B), qui d'après nos analyses *in silico*, ne devrait pas affecter la structure de la région distale de la tige-boucle 3', ni la séquence de la boucle apicale, il est surprenant que cette mutation abolisse la liaison de LARP7. Néanmoins, cette délétion détruit la boucle latérale située au centre de la tige-boucle 3' qui, même si sa séquence n'est pas essentielle pour la liaison de LARP7, peut être un élément structural crucial pour la reconnaissance par LARP7. Cette délétion modifie également la distance entre la boucle apicale de la tige-boucle 3' et l'extrémité 3'-UUU-OH de l'ARN. Il est donc possible que le maintien de la distance entre les deux éléments du snARN 7SK identifiés comme essentiels pour la liaison de LARP7 joue un rôle important dans cette liaison. Pour vérifier cette hypothèse, un mutant du snARN 7SK (7SK_{ext}) portant une extension de 20 nucléotides entre la tige-boucle 3' et son extrémité 3'-UUU-OH a été exprimé transitoirement dans des cellules HeLa en culture et la capacité de liaison de LARP7

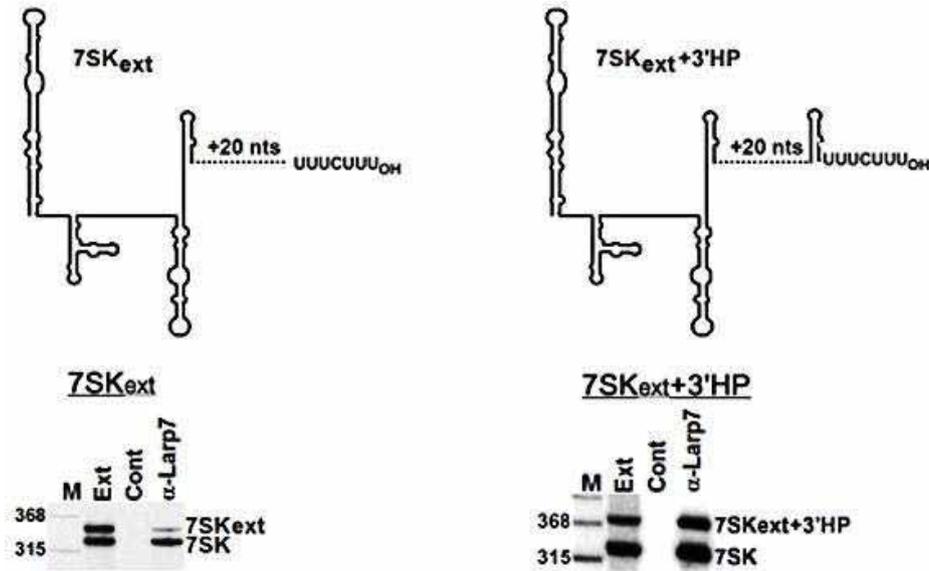


Figure 5 : La distance entre l'extrémité 3'-UUU-OH du snARN 7SK et la boucle apicale de sa tige-boucle 3' est importante pour la liaison de LARP7

Les structures secondaires prédites des mutants du snARN 7SK sont représentées. L'interaction de ces mutants du snARN 7SK, exprimés transitoirement dans des cellules HeLa, avec la protéine LARP7 endogène a été analysée par co-immunoprécipitation avec un anticorps anti-LARP7. Les snARN 7SK endogène (7SK) et mutants co-précipités avec LARP7 ont été analysés par Northern blot.

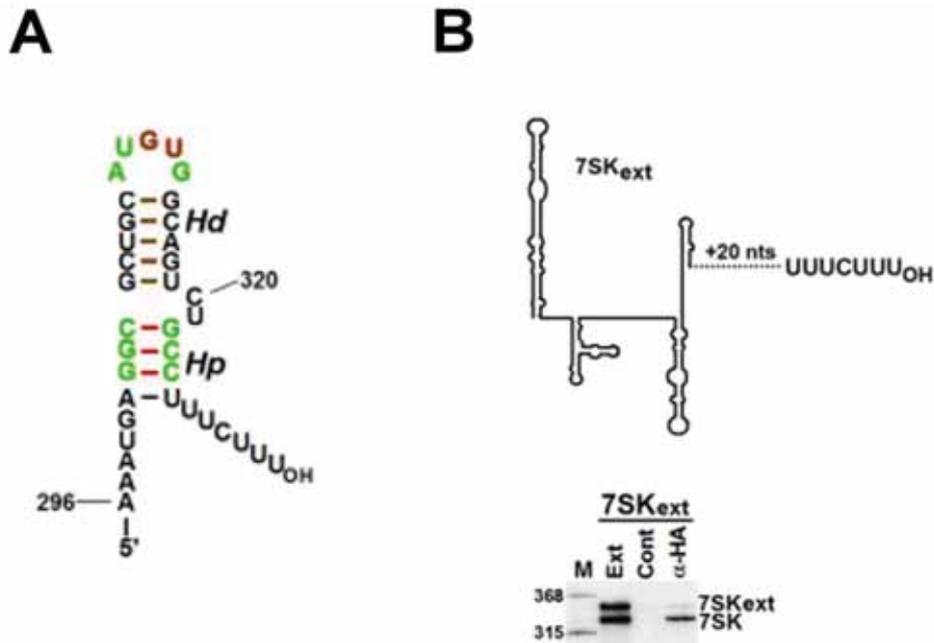


Figure 6 : Les éléments de la tige-boucle 3' du snARN 7SK nécessaires à la liaison de LARP7 chevauchent les éléments nécessaires à la liaison de P-TEFb

A) Les éléments nécessaires à la liaison de P-TEFb (en vert) (Egloff et al, 2006) et les éléments nécessaires à la liaison de LARP7 (en rouge) sont indiqués sur une représentation schématique de la structure secondaire prédite de la tige-boucle 3' du snARN 7SK. Lorsque la séquence nucléotidique est importante, les nucléotides sont colorés. Lorsque la structure est importante, les tirets représentant l'appariement des bases sont colorés. La séquence 3'-UUUCUUU-OH n'est pas colorée en rouge bien qu'elle soit essentielle à la liaison de LARP7 car son implication dans la liaison de P-TEFb n'a pas été étudiée. B) Le mutant 7SK_{ext} du snARN 7SK a été exprimé transitoirement dans des cellules G3H exprimant stablement la cycline T1 étiquetée HA. L'interaction de ce mutant du snARN 7SK avec P-TEFb a été analysée par co-immunoprécipitation avec des billes d'agarose anti-HA (Sigma). Les snARN 7SK endogène (7SK) et mutant (7SK_{ext}) co-précipités avec P-TEFb ont été analysés par Northern blot.

-RESULTATS-

Chapitre II : Analyse structurale des sites de liaison des protéines LARP7 et MePCE au snARN 7SK

à ce mutant a été déterminée par co-immunoprécipitation (figure 5). D'après nos analyses *in silico* réalisées avec le programme RNAfold, l'addition de cette séquence de 20 nucléotides ne devrait pas modifier la structure secondaire de la tige-boucle 3'. Néanmoins, cette mutation affecte significativement la liaison de LARP7. Cela suggère que la distance entre les deux éléments essentiels pour la liaison de LARP7 au snARN 7SK, à savoir la boucle apicale de la tige-boucle 3' et l'extrémité 3'-UUU-OH, est également importante pour la liaison de LARP7. Pour confirmer ces résultats, nous avons rétabli la distance nécessaire entre les éléments requis pour la liaison de LARP7 en rajoutant une deuxième tige-boucle à la suite de l'extension de 20 nucléotides à l'extrémité 3' du mutant 7SK_{ext}. L'ARN 7SK_{ext}+3'HP résultant a été exprimé transitoirement dans des cellules HeLa et la capacité de liaison de LARP7 à cet ARN a été déterminée par co-immunoprécipitation suivie d'une analyse par Northern blot (figure 5). Cette mutation restaure parfaitement la liaison de LARP7 au snARN 7SK, indiquant que le maintien de la distance entre l'extrémité 3'-UUU-OH et la boucle apicale de la tige-boucle 3' du snARN 7SK est essentiel à la liaison de LARP7.

Les éléments ARN dirigeant la liaison de LARP7 à la tige-boucle 3' du snARN 7SK chevauchent les éléments nécessaires pour la liaison de P-TEFb

Au cours de l'analyse mutationnelle de la tige-boucle située à l'extrémité 3' du snARN 7SK, nous avons remarqué que les éléments de cette région nécessaires pour la liaison de LARP7 chevauchent les éléments requis pour la liaison de P-TEFb (figure 6A). Il a été montré qu'au sein de la tige-boucle 3' du snARN 7SK, les éléments essentiels pour la liaison de P-TEFb sont les séquences nucléotidiques de la boucle apicale, de la partie proximale Hp de cette tige-boucle et de la boucle latérale, de même que le maintien de l'appariement des bases de la partie distale Hd de cette tige-boucle (Egloff et al., 2006). Or, nous avons montré que la séquence de la boucle apicale et l'appariement des bases dans les parties distale Hd et proximale Hp de la tige-boucle 3' du snARN 7SK sont essentiels pour la liaison de LARP7. Ainsi, tous les éléments identifiés comme essentiels pour la liaison de LARP7 le sont également pour la liaison de P-TEFb. Nous avons également analysé l'effet de l'extension de 20 nucléotides introduite entre l'extrémité 3'-UUU-OH et la tige-boucle 3' du snARN 7SK sur l'interaction avec P-TEFb. Pour cela, l'ARN 7SK_{ext} a été exprimé transitoirement dans des cellules humaines G3H, exprimant stablement une version étiquetée HA de la CycT1. La capacité de liaison de P-TEFb à cet ARN exprimé de manière ectopique a été déterminée par co-immunoprécipitation avec le complexe HA-CycT1/CDK9, suivie par une analyse en Northern blot (figure 6B). Cette mutation qui ne modifie aucun des éléments décrits comme essentiels pour la liaison de P-TEFb mais qui affecte sévèrement la liaison de LARP7, affecte également la liaison de P-TEFb, confirmant les résultats obtenus. Sans exception, toutes les altérations du snARN 7SK affectant la liaison de LARP7 affectent également la liaison de P-TEFb. Sachant qu'*in vitro* CDK9 peut interagir directement avec LARP7 (Markert et al., 2008) et que LARP7 peut interagir avec le snARN 7SK en l'absence de P-TEFb, ces résultats suggèrent que la liaison de P-TEFb à la tige-boucle 3' du snARN 7SK pourrait être médiée par LARP7. Néanmoins, certains éléments essentiels pour la liaison de P-TEFb à la tige-boucle 3', tels que la séquence de la boucle latérale ou la séquence de la tige proximale Hp, ne sont pas requis pour la liaison de LARP7. Cela suggère que le recrutement de P-TEFb au niveau de la tige-boucle 3' du snARN 7SK nécessite également un autre type d'interaction intermoléculaire avec la tige-boucle 3'.

La protéine MePCE se lie spécifiquement au snARN 7SK *in vivo*

Pour déterminer si la protéine MePCE interagit uniquement avec le snARN 7SK ou si elle peut également interagir avec d'autres ARN, la protéine MePCE étiquetée Myc-FLAG à son extrémité carboxy-terminale a été exprimée transitoirement dans des cellules HeLa en culture.

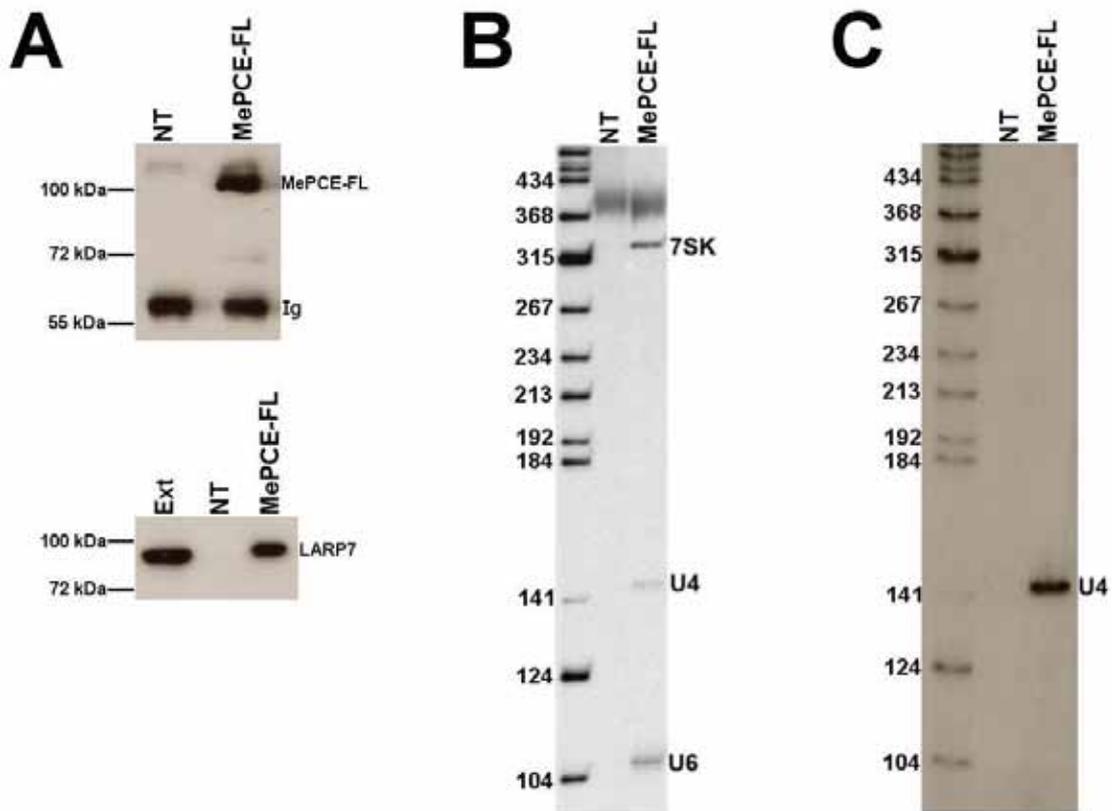


Figure 7 : La protéine MePCE interagit avec les snARN 7SK, U6 et U4 *in vivo*

A) La protéine MePCE-FLAG (MePCE-FL) a été exprimée transitoirement dans des cellules HeLa. MePCE-FL a été immunoprécipitée (anticorps α -FLAG) à partir de cellules transfectées (MePCE-FL) ou non (NT). La précipitation de MePCE et la co-précipitation de LARP7 ont été analysées par Western blot. B) Les ARN co-précipités avec MePCE-FL ont été radiomarqués puis séparés sur un gel dénaturant. C) Pour confirmer l'identité de l'ARN ayant une mobilité électrophorétique similaire à celle du snARN U4, les ARN co-précipités avec MePCE ont été analysés par Northern blot en utilisant un oligonucléotide spécifique du snARN U4.

-RESULTATS-

Chapitre II : Analyse structurale des sites de liaison des protéines LARP7 et MePCE au snARN 7SK

La capacité de liaison de cette protéine exprimée ectopiquement aux ARN cellulaires a été déterminée par co-immunoprécipitation avec un anticorps anti-FLAG. Comme démontré par l'analyse par Western blot, la protéine MePCE-FLAG est efficacement exprimée dans les cellules HeLa en culture et interagit avec la protéine LARP7 endogène (figure 7A). Après avoir été radiomarqués à leur extrémité 3', les ARN co-précipités avec MePCE-FLAG ont été analysés sur un gel dénaturant (figure 7B). Confirmant les résultats obtenus par d'autres équipes (Jeronimo et al., 2007), l'autoradiographie a révélé que MePCE-FLAG se lie spécifiquement à deux ARN ayant une mobilité électrophorétique correspondant aux snARN U6 et 7SK humains. De façon surprenante, cette analyse montre que MePCE-FLAG interagit également avec un troisième ARN ayant une mobilité électrophorétique correspondant au snARN U4. Pour confirmer l'identité de cet ARN ayant une mobilité électrophorétique correspondant au snARN U4, nous avons réalisé une analyse par Northern blot en utilisant un oligonucléotide spécifique du snARN U4 (figure 7C). Ces analyses ont confirmé l'identité du troisième ARN spécifiquement co-précipité avec MePCE-FLAG dans les cellules HeLa comme étant le snARN U4.

N'ayant pas d'anticorps nous permettant de précipiter efficacement la protéine MePCE endogène, nous n'avons pas pu réaliser d'immuno-déplétion de cette protéine afin de déterminer la fraction de snARN 7SK associée à cette protéine.

MePCE s'associe au snARN 7SK même lorsqu'il ne porte pas de coiffe γ -monométhyl phosphate

Dans les cellules humaines, la protéine MePCE se lie donc spécifiquement aux snARN U6 et 7SK qui sont les deux seuls snARN humains identifiés à ce jour comme possédant une coiffe γ -monométhyl phosphate. Il est donc possible qu'après avoir méthylylé le phosphate en position γ du premier nucléotide en 5' du snARN 7SK, MePCE reste associée à cette structure particulière. Pour vérifier si MePCE se lie uniquement à cette structure particulière du snARN 7SK, nous avons placé le snARN 7SK sous le contrôle du promoteur du gène codant le snARN U1, qui est lui synthétisé par l'ARN pol II, afin d'obtenir un snARN 7SK ne possédant pas la coiffe γ -monométhyl phosphate. En effet, les ARN synthétisés par l'ARN pol II sont modifiés co-transcriptionnellement par l'addition d'une coiffe 7-méthyl G5'ppp5'N (m7G) lorsque la taille du transcrit naissant atteint entre 25 et 50 nucléotides. Il est donc probable que le snARN 7SK exprimé sous le contrôle du promoteur du gène codant le snARN U1 possèdera une coiffe m7G. Nous avons donc construit un vecteur d'expression contenant le promoteur du gène U1, en aval duquel nous avons placé la séquence codante du snARN 7SK, séparée de la boîte 3' de U1 par l'extension normalement retrouvée à l'extrémité 3' du pre-snARN U1 (figure 8A). Pour pouvoir distinguer cet ARN exprimé ectopiquement dans des cellules HeLa du snARN 7SK endogène, une mutation de la boucle apicale de la troisième structure en tige-boucle du snARN 7SK (M11), n'affectant pas la liaison de MePCE (figure 8A), a été introduite dans cet ARN et des protections à la RNase A/T1 ont été réalisées en utilisant une sonde ARN antisens spécifique du mutant. Bien que son accumulation soit relativement faible par rapport au niveau de snARN 7SK endogène, le snARN 7SK mutant placé sous le contrôle du promoteur du gène U1 est exprimé dans les cellules HeLa et présente une mobilité électrophorétique correspondant à celle du snARN 7SK endogène. Cela suggère que l'extension en 3' que nous avons introduite entre la série de U, formant normalement l'extrémité 3'-OH du snARN 7SK, et la boîte 3' de U1, servant de terminateur de la transcription, a été dégradée. Pour vérifier que cet ARN est bien synthétisé par l'ARN pol II, les cellules ont été traitées avec de l' α -amanitine ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) qui, à de faibles concentrations, inhibe la transcription par l'ARN pol II mais n'affecte pas la transcription par l'ARN pol III. Nous avons confirmé, en quantifiant par Q-RT-PCR les

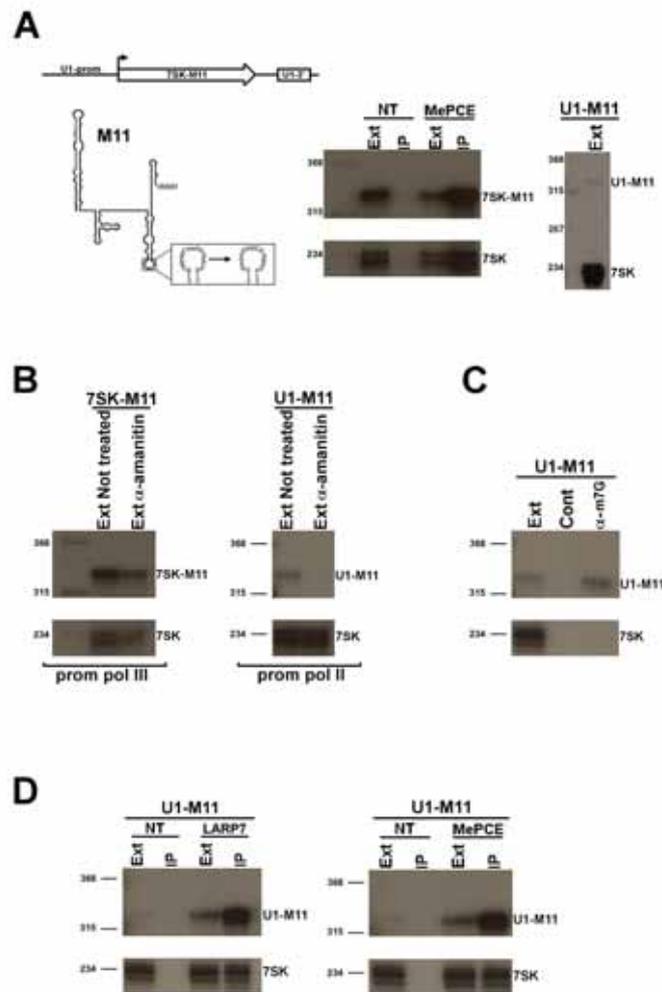


Figure 8 : MePCE interagit avec le snARN 7SK même lorsque ce dernier ne porte pas de coiffe γ -monomethyl phosphate

A) Représentation schématique du vecteur d'expression pU1-M11 contenant le promoteur du gène U1, en aval duquel est placée la séquence codante (flèche ouverte) du mutant M11 du snARN 7SK, séparée de la boîte 3' de U1 par l'extension normalement retrouvée à l'extrémité 3' du pré-snARN U1. La mutation M11 est représentée. L'interaction de MePCE avec le mutant 7SK-M11 (mutant M11 placé sous le contrôle du promoteur du gène 7SK) a été analysée par co-immunoprécipitations suivie par des protections à la RNase A/T1 en utilisant une sonde ARN antisens spécifique du mutant. L'accumulation dans des cellules HeLa du mutant U1-M11 (mutant M11 placé sous le contrôle du promoteur du gène U1) exprimé transitoirement a été analysée par une expérience de protection à la RNase A/T1 en utilisant une sonde spécifique de ce mutant. B) Les snARN 7SK-M11 et U1-M11 ont été exprimés transitoirement dans des cellules HeLa. Ces cellules ont ensuite été traitées (Ext α -amanitin) ou non (Ext Not treated) avec de l' α -amanitine ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$). La production des snARN 7SK-M11 et U1-M11 a ensuite été analysée par des protections à la RNase A/T1. C) La présence d'une coiffe γ -monomethyl phosphate à l'extrémité 5' du snARN U1-M11 a été analysée par immunoprécipitation avec un anticorps anti-m7G reconnaissant spécifiquement la coiffe 7-methyl G5'ppp5'N, suivie par une protection à la RNase A/T1. D) L'interaction du mutant U1-M11 avec les protéines LARP7 étiquetée FLAG et MePCE-FL, exprimées ectopiquement dans des cellules HeLa, a été analysée par co-immunoprécipitations suivies de protections à la RNase A/T1.

-RESULTATS-

Chapitre II : Analyse structurale des sites de liaison des protéines LARP7 et MePCE au snARN 7SK

niveaux de pré-snARN U2 et d'ARNr 5S produits dans ces cellules par rapport à des cellules HeLa non traitées, que le traitement effectué inhibe la transcription par l'ARN pol II mais n'affecte pas la transcription par l'ARN pol III. Les protections à la RNase A/T1 montrent que le traitement des cellules avec l' α -amanitine affecte la synthèse de l'ARN mutant M11 placé sous le contrôle du promoteur du gène U1 (U1-M11), tandis qu'elle n'affecte ni la transcription du M11 placé sous le contrôle de son propre promoteur (7SK-M11), ni la transcription du snARN 7SK endogène (figure 8B). L'ARN U1-M11 exprimé ectopiquement est donc synthétisé par l'ARN pol II. Pour vérifier que cet ARN synthétisé par l'ARN pol II possède une coiffe différente du snARN 7SK endogène, nous avons réalisé des immunoprécipitations en utilisant un anticorps anti-m7G reconnaissant spécifiquement la coiffe 7-méthyl G5'ppp5'N (figure 8C). Contrairement au snARN 7SK endogène, le snARN 7SK synthétisé par l'ARN pol II est précipité par l'anticorps anti-m7G, confirmant que cet ARN exprimé ectopiquement possède une coiffe différente de celle du snARN 7SK endogène. Enfin, avant d'analyser la capacité de liaison de MePCE à cet ARN, nous avons vérifié que ce dernier est correctement replié à son extrémité 3' et que la séquence 3'-UUU-OH du snARN 7SK n'est pas affectée par la dégradation de l'extension 3'. Pour cela, nous avons analysé la capacité de liaison de la protéine LARP7 étiquetée FLAG, exprimée ectopiquement dans des cellules HeLa, avec cet ARN par des co-immunoprécipitations suivies de protections à la RNase A/T1 (figure 8D). De façon surprenante LARP7 interagit avec cet ARN plus fortement qu'avec le snARN 7SK endogène, indiquant qu'il est probablement correctement replié. Nous avons ensuite analysé la capacité de liaison à cet ARN de MePCE (figure 8D). De façon surprenante, tout comme c'est le cas de LARP7, la protéine MePCE-FLAG interagit avec cet ARN synthétisé par l'ARN pol II plus fortement qu'avec le snARN 7SK endogène. Ces résultats suggèrent que la présence de la coiffe γ -monométhyl phosphate sur le snARN 7SK n'est pas essentielle pour la liaison de MePCE.

Plusieurs éléments sont requis pour la liaison de MePCE au snARN 7SK

Si la coiffe γ -monométhyl phosphate du snARN 7SK n'est pas l'élément déterminant la liaison de MePCE, d'autres éléments de cet ARN sont probablement à l'origine de cette liaison. Afin de déterminer ces éléments, nous avons analysé l'interaction d'ARN 7SK tronqués, exprimés transitoirement dans des cellules HeLa en culture, avec MePCE-FLAG par des co-immunoprécipitations avec un anticorps anti-FLAG suivies par des analyses par Northern blot (figure 9). L'ARN minimal 7SK5'+3'hp, constitué des tige-boucles situées aux extrémités 5' et 3' du snARN 7SK mais présentant une délétion de toute sa région centrale U116-C295, interagit avec MePCE (figure 9A). De même, les ARN 7SK-5'hp, 7SK-5'hpdist et 7SK-5'hp approx portant des délétions dans la tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK, interagissent avec MePCE (figure 9B). Enfin, bien que sa capacité à interagir avec MePCE soit réduite, l'ARN minimal 7SK5'hp, constitué uniquement de la tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK et de la série de U constituant le signal de terminaison de la transcription par l'ARN pol III, s'associe avec MePCE (figure 9C). Nous avons donc délété toutes les régions du snARN 7SK, à l'exception des premiers nucléotides situés à la base de la tige-boucle 5' du snARN 7SK (G1 à G5), sans qu'aucune de ces mutations n'abolisse la liaison de MePCE. Cela suggère que les éléments nécessaires à la liaison de la protéine MePCE pourraient se situer à la base de la tige-boucle 5' du snARN 7SK. Or, il a été montré que le signal d'ajout de la coiffe γ -monométhyl phosphate aux snARN U6 et 7SK comprend une tige-boucle située à l'extrémité 5' de l'ARN suivie d'une courte région simple brin. La taille de la tige-boucle varie entre ces ARN sans que cela n'affecte significativement l'efficacité d'ajout de la coiffe (Shumyatsky et al., 1994). Même si la coiffe γ -monométhyl phosphate ne semble pas essentielle pour la liaison de MePCE au snARN 7SK, il est possible

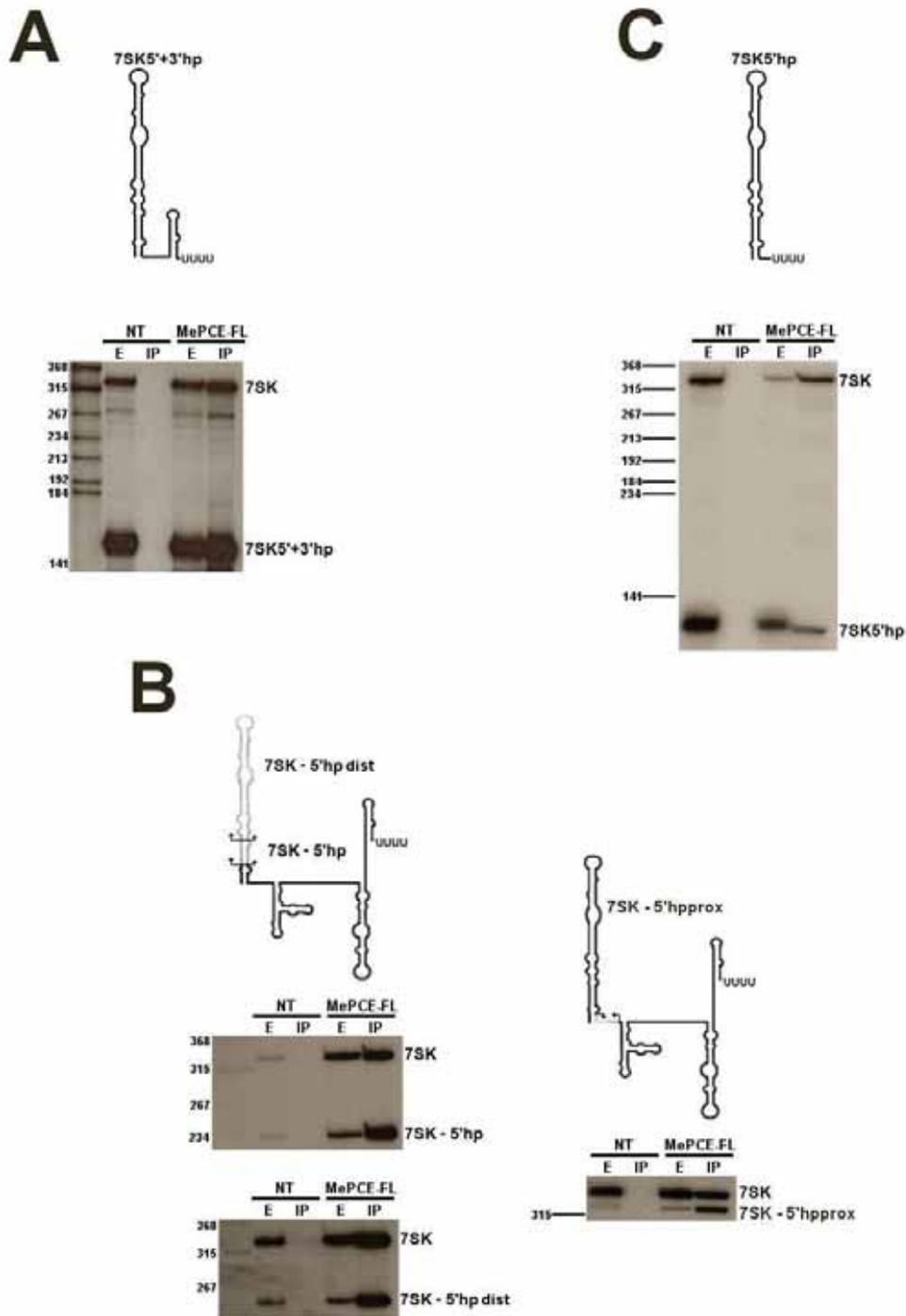


Figure 9 : Aucun élément du snARN 7SK ne semble essentiel pour la liaison de MePCE en présence de LARP7

A), B) et C) Les structures secondaires prédites des différents snARN 7SK tronqués sont représentées. Les snARN 7SK tronqués et la protéine MePCE-FL ont été co-exprimés transitoirement dans des cellules HeLa. La protéine MePCE-FL a été immunoprécipitée à partir des cellules HeLa transfectées. La co-précipitation avec MePCE-FL des snARN 7SK endogène (7SK) et mutants a été analysée par Northern blot.

-RESULTATS-

Chapitre II : Analyse structurale des sites de liaison des protéines LARP7 et MePCE au snARN 7SK

que les éléments constituant le signal d'ajout de la coiffe, qui sont donc reconnus par MePCE, soient eux importants pour cette liaison. Ainsi, afin de définir précisément le site de liaison de MePCE sur le snARN 7SK, de nouveaux mutants ont été produits à partir de l'ARN minimal 7SK5'hp. En effet, si l'on compare les résultats obtenus avec l'ARN minimal 7SK5'hp (figure 9C) et l'ARN minimal 7SK5'+3'hp (figure 9A), la délétion de la tige-boucle 3' affecte significativement la liaison de MePCE au snARN 7SK. Or, comme nous l'avons montré la protéine LARP7 se lie à la tige-boucle 3' du snARN 7SK, et une interaction entre MePCE et LARP7, indépendante du snARN 7SK, a été mise en évidence (Barboric et al., 2009; Xue et al., 2010). Il est donc possible que LARP7 stabilise l'interaction entre MePCE et le snARN 7SK, auquel cas, il sera plus facile de définir le site de liaison de MePCE en s'affranchissant de la liaison de LARP7. L'association de ces ARN mutés avec MePCE-FLAG a été analysée par co-immunoprécipitations suivies par des Northern blot (figure 10A). Nous avons ainsi montré que les mutations des nucléotides G2 (5'hp1) ou A3 (5'hp2) du snARN 7SK abolissent l'interaction de MePCE, tandis que la mutation du nucléotide U4 (5'hp3) n'affecte pas significativement cette interaction. L'importance du premier nucléotide (G1), situé à l'extrémité 5' du snARN 7SK, pour la liaison de MePCE, n'a pas pu être déterminée car la mutation de ce nucléotide entraîne un défaut sévère d'accumulation de ce mutant (données non montrées), qui peut être lié soit à un défaut de transcription, soit à un problème de stabilité de cet ARN. Par ailleurs, la mutation des nucléotides U106, C107 et C108 (5'hp4), qui dans le contexte de l'ARN minimal 7SK5'hp sont vraisemblablement appariés aux nucléotides G1, G2 et A3 situés à l'extrémité 5' du snARN 7SK, abolit la liaison de MePCE. Ainsi, les nucléotides G2, A3, et les nucléotides qui leur sont appariés dans le contexte de l'ARN minimal 7SK5'hp, semblent essentiels pour la liaison de MePCE. Néanmoins, ces mutations abolissant l'appariement des nucléotides situés à la base de la tige-boucle 5', il est possible que seule la structure secondaire de la base de la tige-boucle 5' du snARN 7SK soit cruciale pour la liaison de MePCE. Par ailleurs, la mutation des trois premiers nucléotides A109, U110 et G111 de la région suivant la tige-boucle 5' du snARN 7SK (5'hp5), qui dans le contexte de l'ARN minimal 7SK5'hp sont vraisemblablement non appariés, abolit également la liaison de MePCE, indiquant que la composition en nucléotides de cette région simple brin suivant la tige-boucle 5' du snARN 7SK est essentielle pour la liaison de MePCE.

Pour confirmer ces résultats dans le contexte du snARN 7SK pleine taille, nous avons introduit des mutations dans les éléments identifiés ci-dessus comme importants pour la liaison de MePCE dans une construction portant également une mutation abolissant la liaison de LARP7 (mutant m2, figure 4B). Néanmoins, nous n'avons pas pu analyser l'interaction de MePCE-FLAG avec ces nouveaux mutants, car aucun d'entre eux ne s'accumule suffisamment dans les cellules HeLa en culture (données non montrées). Cela pourrait être dû au fait qu'ayant perdu leur capacité de liaison aux protéines MePCE et LARP7, ces ARN sont rapidement dégradés par des exonucléases après leur synthèse. Nous avons donc introduit ces mêmes mutations dans l'ARN minimal 7SK5'+3'hp qui semble plus stable que le snARN 7SK pleine taille. La mutation des nucléotides G2, A3 et U4 au sein de l'ARN minimal 7SK5'+3'hp (5'+3'hp1), qui n'affecte pas l'interaction de LARP7, diminue significativement la liaison de MePCE (figure 10B). Lorsqu'une mutation abolissant la liaison de LARP7 est introduite dans cette construction (5'+3'hp2), cela abolit l'interaction de MePCE. Nous avons ainsi confirmé que les nucléotides G2 et A3 du snARN 7SK sont importants pour la liaison de MePCE, qui est stabilisée par la liaison de LARP7 au snARN 7SK.

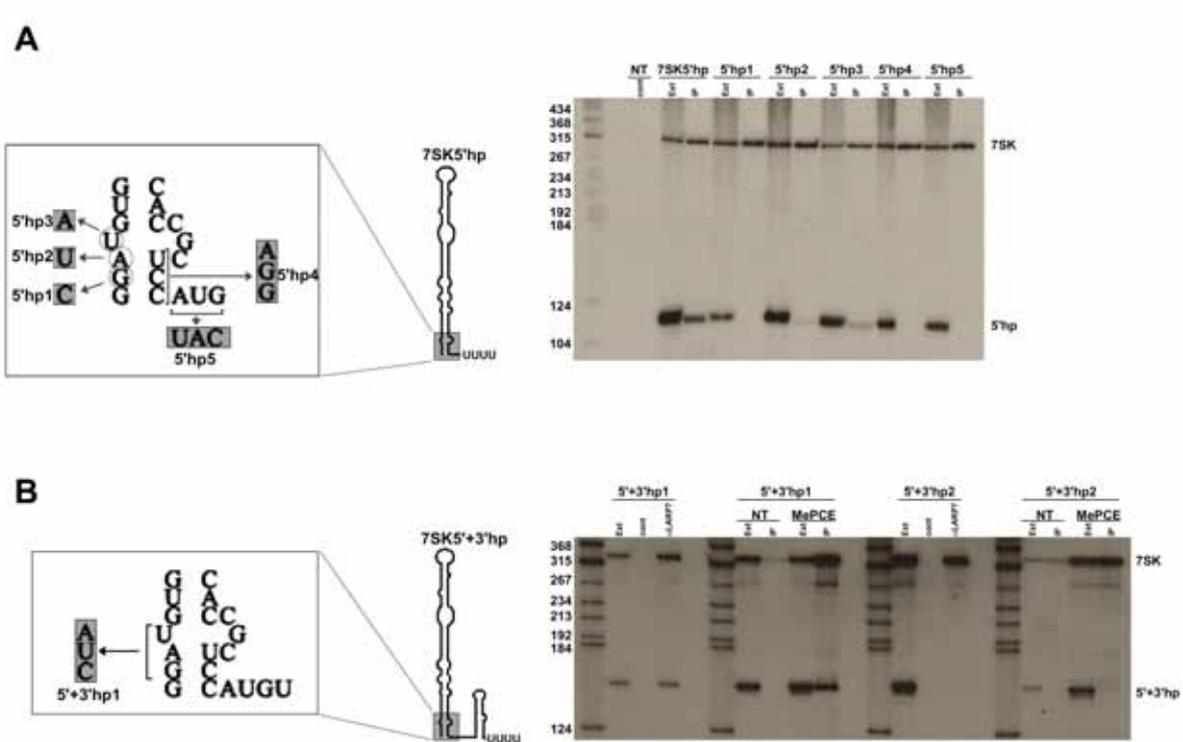


Figure 10 : Eléments requis pour la liaison de MePCE au snARN 7SK

A) La structure secondaire prédite du snARN 7SK minimal 5'hp ainsi que les mutations qui ont été introduites dans cet ARN minimal sont représentées. Les snARN 7SK minimaux mutés et la protéine MePCE-FL ont été co-exprimés transitoirement dans des cellules HeLa. La protéine MePCE-FL a été immunoprécipitée à partir des cellules HeLa transfectées. La co-précipitation avec MePCE-FL des snARN 7SK endogène (7SK) et minimaux mutés (5'hp) a été analysée par Northern blot.

B) La structure secondaire prédite du snARN 7SK minimal 5'+3'hp ainsi que la mutation qui a été introduite dans l'ARN minimal 5'+3'hp1 sont représentées. L'ARN minimal 5'+3'hp2 porte la mutation représentée sur le schéma (5'+3'hp1) ainsi qu'une mutation dans la boucle apicale de la tige-boucle 3' (non représentée). Les snARN 7SK minimaux mutés ont été exprimés transitoirement dans des cellules HeLa. Leur interaction avec la protéine LARP7 endogène a été analysée par co-immunoprécipitation avec un anticorps anti-LARP7 suivie par des Northern blot. Dans un deuxième temps, les snARN 7SK minimaux mutés et la protéine MePCE-FL ont été co-exprimés transitoirement dans des cellules HeLa. La protéine MePCE-FL a été immunoprécipitée à partir des cellules HeLa transfectées. La co-précipitation avec MePCE-FL des snARN 7SK endogène (7SK) et minimaux mutés (5'+3'hp) a été analysée par Northern blot.

-RESULTATS-

Chapitre II : Analyse structurale des sites de liaison des protéines LARP7 et MePCE au snARN 7SK

IV) Conclusion

Par des analyses mutationnelles détaillées, nous avons défini les éléments du snARN 7SK nécessaires pour la liaison des protéines LARP7 et MePCE, qui stabilisent le snARN 7SK et facilitent l'assemblage de la snRNP 7SK coeur. Les éléments nécessaires pour l'interaction de LARP7 sont situés dans la région 3' du snARN 7SK, tandis que les éléments nécessaires pour l'interaction de MePCE sont situés dans la région 5' du snARN 7SK. En accord avec leur rôle crucial dans le maintien de la stabilité du snARN 7SK, les éléments identifiés comme étant essentiels pour la liaison de LARP7 et MePCE au snARN 7SK sont très conservés au cours de l'évolution (Egloff et al., 2006).

L'analyse mutationnelle détaillée de la région 3' du snARN 7SK montre que toute altération de cette région de l'ARN affectant la liaison de LARP7, affecte également la liaison de P-TEFb. Cela suggère que l'interaction entre P-TEFb et le snARN 7SK dans cette région est dépendante d'une interaction protéine-protéine entre LARP7 et P-TEFb.

V) Matériel et méthodes

V-1) Culture cellulaire

Les cellules humaines HeLa et les cellules G3H exprimant stablement la CycT1 étiquetée HA, ont été cultivées dans une atmosphère à 37°C et 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal décomplémenté 1h à 56°C. Les cellules HeLa et G3H ont été transfectées par les différents vecteurs d'expression en suivant le protocole standard de transfection au JetPrime (Polyplus transfection). Les cellules ont été traitées ou non à l' α -amanitine (1 μ g.mL⁻¹) pendant 1 heure.

V-2) Immunoprécipitations

Les cellules ont été lavées dans du tampon PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄), resuspendues dans 500 μ L de tampon NET-2 (150 mM NaCl, 0,05% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) et soniquées 5 fois 30 sec. Les débris cellulaires ont été collectés par centrifugation à 15000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a ensuite été clarifié par une ultracentrifugation à 60000 rpm pendant 1h à 4°C. Le surnageant a ensuite été incubé pendant 1h en présence de 20 μ L de billes protéine A-agarose (Sigma) saturées avec l'anticorps anti-LARP7 (Euromedex, ARP40847_P050) ou en présence de 20 μ L de billes anti-FLAG M2 (Sigma, A2220) ou de billes d'agarose anti-HA (Sigma). Après immunoprécipitation, les billes ont été lavées 5 fois avec 1 mL de tampon NET-2. Les ARN ont été extraits par traitement des billes à la protéinase K (0,2 mg/mL) suivi d'une extraction au phénol/chloroforme.

V-3) Analyse des ARN

Pour les Northern blot, les ARN ont été séparés sur gel d'acrylamide 6% et electro-transférés sur une membrane Hybond-N (Amersham). Pour la détection des snARN 7SK endogènes et mutants, les oligonucléotides GTGTCTGGAGTCTTGGAAGC ou CATGGAGCGGTGAGGGAGGA complémentaires de différentes régions du snARN 7SK ont été utilisés comme sonde après avoir été marqués à leur extrémité 5' par la T4 polynucléotide kinase en présence de [γ -³²P]-ATP (3000 Ci/mmol, Perkin Elmer). Le [γ -³²P]-ATP non incorporé a été séparé des oligonucléotides marqués par un passage sur une colonne Sephadex G-25.

-RESULTATS-

Chapitre II : Analyse structurale des sites de liaison des protéines LARP7 et MePCE au snARN 7SK

Le protocole utilisé pour les protections à la RNase A/T1 a été décrit précédemment (Goodall et al., 1990). Pour synthétiser les sondes ARN antisens spécifiques, les vecteurs d'expression de 7SK appropriés ont été linéarisés et utilisés comme matrice pour des transcriptions *in vitro* avec l'ARN pol T7 en présence de [α - 32 P]-CTP (3000 Ci/mmol, Perkin Elmer).

Pour le marquage à l'extrémité 3', les ARN co-immunoprécipités avec les protéines LARP7 endogène ou MePCE-FLAG ont été incubés sur la nuit à 4°C en présence de [5'- 32 P]pCp et de T4 ARN ligase puis séparés sur un gel d'acrylamide 6%.

PARTIE III
-DISCUSSION-

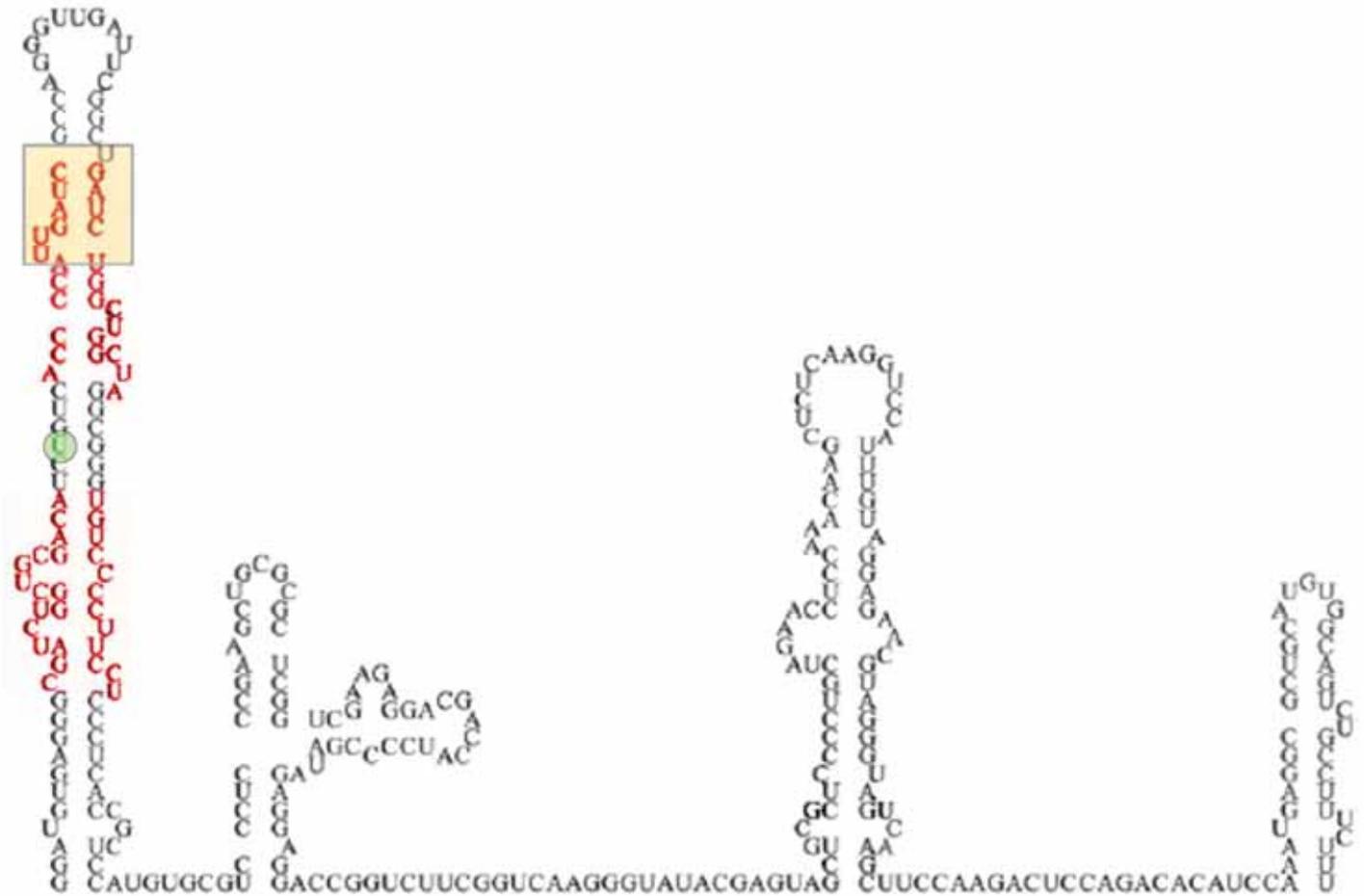


Figure 34 : Sites de liaison d’HEXIM sur le snARN 7SK

Les motifs A34-C45/G64-A77 et C12-A27/U84-U95 (représentés en rouge) localisés respectivement dans les parties distale et proximale de la tige-boucle 5’ du snARN 7SK sont impliqués dans la liaison d’un dimère d’HEXIM (Muniz et al, 2010).

Une analyse par Résonance Magnétique Nucléaire a montré que le motif G42-C45/G64-C67 ainsi que les boucles latérales constituées d’uridines l’entourant (encadré en orange) sont requis pour la liaison d’HEXIM (Lebars et al, 2010).

Enfin, il a été montré qu’HEXIM contacte également spécifiquement le nucléotide U30 de la tige-boucle 5’ du snARN 7SK (entouré en vert) (Bélangier et al, 2009).

Chapitre I : Contrôle de l'activité cellulaire de P-TEFb par la protéine Tat du VIH-1

1) Les éléments du snARN 7SK importants pour la liaison des protéines HEXIM

Comme nous l'avons vu dans le chapitre III, la liaison d'un dimère d'HEXIM au snARN 7SK est un pré-requis pour la séquestration de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK. Tous les éléments nécessaires pour la liaison d'HEXIM au snARN 7SK sont localisés dans la tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK (Egloff et al., 2006). Une analyse mutationnelle nous a permis de montrer que deux motifs distincts, l'un situé dans la partie proximale (C12-A27/U84-U95) et l'autre dans la partie distale (A34-C45/G64-A77) de la tige-boucle 5' du snARN 7SK, sont impliqués dans la liaison d'un dimère d'HEXIM (figure 34). Ainsi, une altération de la séquence de l'un ou l'autre de ces deux motifs abolit l'interaction d'HEXIM avec le snARN 7SK *in vivo*. Ces deux motifs de liaison fonctionnent donc de manière interdépendante et sont tous deux essentiels pour la liaison des protéines HEXIM au snARN 7SK *in vivo*. De plus, la liaison d'HEXIM étant un pré-requis pour la séquestration de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK, l'altération de l'un ou l'autre de ces deux motifs abolit également l'interaction de P-TEFb avec le snARN 7SK *in vivo*. Ces résultats sont en accord avec les résultats d'une analyse détaillée de la liaison d'HEXIM sur le snARN 7SK par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (Lebars et al., 2010). En effet, cette étude confirme que le motif G42-C45/G64-C67 (GAUC/GAUC), qui fait partie du motif A34-C45/G64-A77 que nous avons identifié, est important pour la liaison d'HEXIM au snARN 7SK (figure 34). La conservation de ce motif au cours de l'évolution (Marz et al., 2009), souligne son rôle essentiel pour la fonction du snARN 7SK. Cette étude par RMN montre que la liaison d'HEXIM requiert également la présence de deux boucles latérales (bulges) constituées d'uridines entourant le motif G42-C45/G64-C67 (figure 34). Cette analyse, bien que très détaillée, ne fait pas état du motif de liaison d'HEXIM dans la partie proximale de la tige-boucle 5'. Cela peut s'expliquer par le fait que dans cette étude, les auteurs se sont plus particulièrement penchés sur l'analyse de la partie distale de la tige-boucle 5' du snARN 7SK (Lebars et al., 2010).

Par ailleurs, de façon intéressante, cette étude montre que la liaison d'un peptide représentant l'ARM (motif riche en arginines, impliqué dans la liaison au snARN 7SK) d'HEXIM au snARN 7SK ouvre le motif GAUC/GAUC important pour la liaison d'HEXIM. La liaison de ce peptide entraîne également une stabilisation du motif C37-A39/U68-G70 situé en dessous du motif GAUC/GAUC sur la tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK (Lebars et al., 2010). Cela montre que, tout comme HEXIM (Barboric et al., 2005), le snARN 7SK subit un changement conformationnel lors de l'interaction avec HEXIM.

Enfin, une étude a montré qu'HEXIM interagit également avec le nucléotide U30 qui est situé sur la tige-boucle 5' du snARN 7SK, entre les deux motifs de liaison que nous avons identifiés comme importants pour la liaison d'HEXIM (figure 34) (Belanger et al., 2009). Cela suggère que les changements conformationnels induits au sein des protéines HEXIM (Barboric et al., 2005; Michels et al., 2004) et du snARN 7SK (Lebars et al., 2010) par la liaison d'un dimère d'HEXIM à la tige-boucle 5' du snARN 7SK favorisent la mise en place de nouveaux contacts entre HEXIM et le snARN 7SK.

II) Libération de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK par la protéine virale Tat

P-TEFb est un co-facteur essentiel pour une transcription efficace du génome du VIH-1 intégré. Or, environ 50% des complexes P-TEFb cellulaires sont séquestrés au sein de la snRNP 7SK/HEXIM/P-TEFb qui représente donc un réservoir important de P-TEFb. Il a été montré que l'infection par le VIH-1 de lymphocytes primaires ou de cellules en culture entraîne une diminution des niveaux de snRNP 7SK contenant le complexe P-TEFb (Barboric et al., 2007; Sedore et al., 2007). Il semble que la protéine Tat du VIH-1 puisse être responsable du désassemblage de la snRNP 7SK dans les cellules infectées. En effet, l'expression de Tat dans des cellules en culture entraîne la libération de P-TEFb à partir des snRNP 7SK en l'absence de tout autre ARN, ADN ou protéine du VIH-1. La libération des complexes P-TEFb permet d'augmenter le niveau de P-TEFb libre disponible pour la transcription du génome proviral.

Les résultats que nous avons obtenus montrent l'existence d'une compétition entre HEXIM et Tat pour la liaison au snARN 7SK *in vivo*. En effet, dans des cellules humaines en culture, la protéine Tat du VIH-1 s'associe spécifiquement au snARN 7SK. Or, les éléments nécessaires pour la liaison de Tat au snARN 7SK appartiennent tous au motif de liaison d'HEXIM situé dans la partie distale de la tige-boucle 5' du snARN 7SK. Nos résultats montrent que l'expression de Tat dans des cellules en culture perturbe l'interaction entre HEXIM et le snARN 7SK. Le désassemblage de la snRNP 7SK provoqué par Tat semble être lié à sa capacité de liaison à l'ARN et non à sa capacité de liaison à la CycT1 du complexe P-TEFb. Ces résultats sont en accord avec une étude menée *in vitro* montrant que la protéine Tat entre en compétition avec HEXIM pour la liaison au snARN 7SK (Sedore et al., 2007).

Néanmoins, d'autres études proposent que la libération de P-TEFb de la snRNP 7SK par Tat repose sur une compétition entre Tat et HEXIM pour la liaison à la sous-unité CycT1 du complexe P-TEFb. En effet, il a notamment été montré que HEXIM1 et Tat se lient à la CycT1 de façon mutuellement exclusive (Schulte et al., 2005). L'interaction de forte affinité entre Tat et la région de la CycT1 qui est normalement contactée par HEXIM avec une plus faible affinité permet à Tat de déplacer directement HEXIM de la CycT1 (Barboric et al., 2007; Dames et al., 2007). De plus, une étude a montré que Tat peut former, un complexe stable avec P-TEFb et tous les autres composants de la snRNP 7SK à l'exception d'HEXIM. La formation de ce complexe semble impliquer une compétition entre Tat et HEXIM pour la liaison à la CycT1 indépendante de leur capacité de liaison à l'ARN (Sobhian et al., 2010).

Une étude menée *in vitro* a montré que le domaine de liaison à la CycT1 et le domaine de liaison à l'ARN de Tat jouent tous deux un rôle important dans la libération de P-TEFb de la snRNP 7SK (Krueger et al., 2010). Ces résultats suggèrent un modèle dans lequel le désassemblage efficace de la snRNP 7SK pourrait être causé par une compétition entre Tat et HEXIM pour la liaison au snARN 7SK et pour la liaison à P-TEFb. L'implication de deux domaines différents de la protéine Tat dans la compétition avec HEXIM pourrait expliquer pourquoi Tat est aussi efficace dans la libération de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK. Par ailleurs, la libération de P-TEFb et HEXIM à partir de la snRNP 7SK s'accompagne d'un changement conformationnel au sein de la tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK qui empêcherait sa ré-association avec HEXIM (Krueger et al., 2010). Ce changement conformationnel pourrait expliquer nos résultats montrant que l'expression de Tat dans des cellules en culture n'affecte pas le niveau de snRNP 7SK/hnRNP. En effet, comme nous l'avons montré, Tat n'entre pas en compétition avec les hnRNP pour la liaison au snARN 7SK et elle ne s'associe pas aux snRNP 7SK/hnRNP. Ces résultats pourraient donc s'expliquer par le fait qu'au sein des molécules de snARN 7SK associées aux hnRNP, la

-DISCUSSION-

Chapitre I : Contrôle de l'activité cellulaire de P-TEFb par la protéine Tat du VIH-1

conformation de la tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK est telle que le motif de liaison de Tat est masqué, empêchant sa liaison.

Des co-facteurs de Tat pourraient également jouer un rôle dans la libération de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK. La phosphatase PP1 α , par exemple, pourrait aider Tat à désassembler le snRNP 7SK. Comme nous l'avons déjà évoqué, en réponse à un stress, cette enzyme déphosphoryle la Thr186 localisée dans la boucle T de CDK9, ce qui entraîne la libération de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK (Chen et al., 2008). De façon intéressante, il a été montré que Tat se lie directement à PP1 α (Ammosova et al., 2005), ce qui pourrait entraîner l'association de cette phosphatase avec la snRNP 7SK, induisant ainsi son désassemblage. En effet, il a récemment été montré que l'inhibition de PP1 α dans des cellules en culture entraîne une augmentation des niveaux de snRNP 7SK et bloque l'activation de la transcription par Tat et la réplication du VIH-1 (Ammosova et al., 2011b).

Enfin, une autre étude montre que Tat s'associe à P-TEFb au sein de la snRNP 7SK et que le complexe ainsi formé est recruté au niveau du complexe de pré-initiation sur le promoteur LTR du VIH-1 (D'Orso and Frankel, 2010). Le recrutement de ce complexe se produit avant l'initiation de la transcription et donc en l'absence de l'ARN TAR. La synthèse de l'ARN TAR permettrait le désassemblage de la snRNP 7SK et la libération de P-TEFb nécessaire pour activer la transcription du génome proviral (D'Orso and Frankel, 2010). Néanmoins, les niveaux de snRNP 7SK détectés au niveau du promoteur LTR sont relativement faibles et ne peuvent pas expliquer les niveaux élevés de P-TEFb recrutés au niveau du LTR lors de la transactivation de la transcription par Tat. Cela suggère qu'en plus des molécules de P-TEFb ainsi pré-chargées sur le promoteur LTR du VIH-1, le recrutement de molécules de P-TEFb libres supplémentaires est requis pour une transactivation efficace de la transcription par Tat. Ces différents mécanismes, impliqués dans la libération de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK, fonctionnent probablement en synergie pour assurer une transactivation efficace de la transcription du génome proviral intégré.

Néanmoins, comme nous l'avons déjà évoqué, P-TEFb n'est pas le seul facteur d'élongation recruté par Tat pour activer la transcription du génome proviral intégré. En effet, la protéine Tat recrute le SEC au niveau du LTR du VIH-1 en interagissant avec l'ARN TAR, permettant à P-TEFb et ELL d'agir de façon coordonnée afin d'activer la transcription (He et al., 2010; Sobhian et al., 2010). De plus, Tat favorise la formation du SEC en stabilisant ELL, qui est normalement une protéine rapidement dégradée par le protéasome (He et al., 2010).

D'un point de vue plus général, tandis que Tat recrute P-TEFb au niveau du promoteur LTR du VIH-1, le facteur Brd4, qui s'associe avec une grande fraction des complexes P-TEFb cellulaires, recrute P-TEFb au promoteur de nombreux gènes (Jang et al., 2005). Or, il a récemment été démontré que tout comme Tat, Brd4 est capable de libérer P-TEFb à partir de la snRNP 7SK (Krueger et al., 2010; Schroder et al., 2012). Il serait intéressant de savoir si d'autres facteurs de transcription cellulaires, identifiés comme interagissant avec P-TEFb, sont également capables de libérer P-TEFb à partir de la snRNP 7SK dans différentes conditions. En effet, il est probable qu'il existe différents mécanismes impliqués dans la libération de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK afin de diriger l'activité de P-TEFb à certains groupes de gènes spécifiques en fonction des besoins de la cellule.

Chapitre II : Les éléments du snARN 7SK importants pour la liaison des protéines LARP7 et MePCE

1) Formation de la snRNP « cœur » MePCE-LARP7-7SK

Le contrôle du niveau nucléaire de P-TEFb libre par sa séquestration au sein de la snRNP 7SK est un mécanisme essentiel pour réguler la transcription par l'ARN pol II, la croissance cellulaire et la prolifération. Dans ce mécanisme de régulation, le snARN 7SK joue un rôle central en servant de plateforme structurale pour l'assemblage coordonné d'HEXIM et de P-TEFb. Or, la stabilité du snARN 7SK et donc la formation des snRNP 7SK dépend des protéines MePCE et LARP7 qui collaborent pour stabiliser le snARN 7SK. Pour mieux comprendre les interactions moléculaires à la base de l'assemblage de la snRNP 7SK régulant la disponibilité de P-TEFb dans les cellules, nous avons déterminé les éléments du snARN 7SK humain dirigeant la liaison de LARP7 et MePCE *in vivo*. Nous avons montré que, en plus de la série de U à l'extrémité 3'-OH du snARN 7SK, la structure en tige-boucle située juste en amont est également essentielle pour la liaison de LARP7 au snARN 7SK. Au sein de cette tige-boucle, la séquence de la boucle apicale ainsi que le maintien de la structure et de la distance entre la boucle apicale et la série de U sont essentiels à la liaison de LARP7. Nous avons montré que ni la tige-boucle située à l'extrémité 5', ni la région centrale du snARN 7SK ne sont essentielles pour la liaison de LARP7. Néanmoins, il faut noter que la délétion de toute la région centrale du snARN 7SK dans le mutant minimal 7SK5'+3'hp affecte la liaison de LARP7 (figure 3). Cela suggère que même si la région centrale du snARN 7SK ne contient pas d'élément essentiel pour la liaison de LARP7, cette région pourrait contribuer à la liaison de LARP7 en facilitant le repliement correct de l'ARN pleine taille. Tandis que LARP7 se lie dans la région située à l'extrémité 3' du snARN 7SK, les éléments nécessaires à la liaison de MePCE comprennent la base de la tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK et la région simple brin suivant cette tige-boucle.

Le fait que MePCE s'associe au snARN 7SK même lorsque ce dernier ne porte pas de coiffe γ -monométhyl phosphate tend à montrer que MePCE s'associe au snARN 7SK indépendamment de sa coiffe particulière. Néanmoins, comme nous l'avons découvert par la suite en essayant de définir les éléments du snARN 7SK nécessaires pour la liaison de MePCE, la présence de LARP7 biaise nos résultats. En effet, il nous a été impossible de déterminer le site de liaison de MePCE en présence de LARP7. Il est possible que via son interaction directe avec LARP7, MePCE co-précipite le snARN 7SK. LARP7 interagissant avec le snARN 7SK synthétisé par l'ARN pol II (U1-M11), on ne peut pas exclure la possibilité que l'interaction que nous détectons soit due à l'interaction de MePCE avec LARP7 et non à son interaction directe avec le snARN 7SK. De plus, tous les éléments que nous avons identifiés comme étant importants pour la liaison de MePCE au snARN 7SK font partie des éléments constituant le signal d'ajout de la coiffe γ -monométhyl phosphate au snARN 7SK (Shumyatsky et al., 1994). On ne peut donc pas exclure que les mutations introduites dans ces éléments abolissent l'interaction de MePCE au snARN 7SK parce qu'elles abolissent l'ajout de la coiffe γ -monométhyl phosphate au snARN 7SK. Il nous faut donc vérifier si la liaison de MePCE au snARN 7SK est réellement indépendante de la coiffe γ -monométhyl phosphate. Pour cela, le clonage d'un vecteur d'expression contenant un mutant du snARN 7SK ayant perdu sa capacité de liaison à LARP7 sous le contrôle du

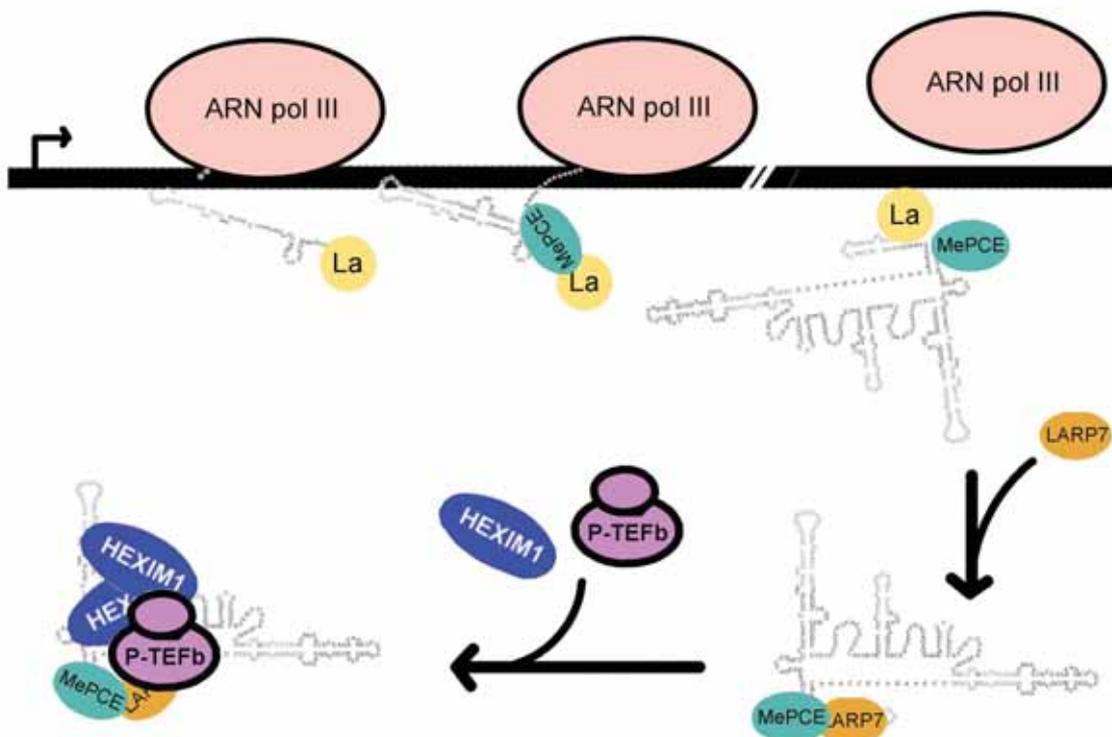


Figure 35 : Modèle représentant l'assemblage de la snRNP 7SK séquestrant le facteur positif d'élongation de la transcription P-TEFb

La protéine La, qui se localise aux promoteurs des gènes transcrits par l'ARN pol III et reconnaît l'extrémité 5' pppG des transcrits pol III naissants pourrait se lier au snARN 7SK naissant. La protéine MePCE pourrait ensuite coiffer le snARN 7SK naissant dès que le signal d'ajout de la coiffe constitué de la tige-boucle 5' suivie d'une séquence simple brin est synthétisé. MePCE resterait alors associée au snARN 7SK. Bien que son interaction avec le snARN 7SK ait été déstabilisée par l'ajout de la coiffe γ -monométhyl phosphate par MePCE, la protéine La se ré-associe rapidement au snARN 7SK via son interaction avec l'extrémité 3'-UUU-OH. La protéine LARP7 entre alors en compétition avec la protéine La pour la liaison à l'extrémité 3' du snARN 7SK. Une fois liée au snARN 7SK LARP7 peut se lier directement à MePCE et inhiber son activité catalytique. En retour, MePCE stabilise l'interaction de LARP7 avec le snARN 7SK. Une fraction des snRNP 7SK « cœur » ainsi assemblées permettra la séquestration de complexes P-TEFb. Pour cela un dimère d'HEXIM se lie à deux motifs parfaitement conservés localisés dans les parties distale et proximale de la tige-boucle située à l'extrémité 5' du snARN 7SK. Cette liaison entraîne un changement conformationnel au sein des protéines HEXIM qui peuvent alors interagir avec P-TEFb et inactiver son activité kinase.

-DISCUSSION-

Chapitre II : Les éléments du snARN 7SK importants pour la liaison des protéines LARP7 et MePCE

promoteur du gène U1 est en cours au laboratoire. L'utilisation de ce snARN 7SK mutant nous permettra de nous affranchir de l'interaction entre LARP7 et MePCE.

Enfin, on ne peut pas exclure qu'une fraction du snARN 7SK exprimé sous le contrôle du promoteur de U1 possède quand même une coiffe γ -monométhyl phosphate. Dans ce cas, on peut envisager que cette fraction des snARN 7SK soit celle qui s'associe à MePCE et LARP7. Néanmoins, cela est très peu probable. En effet, les enzymes de « capping », la guanylyltransférase et la méthyltransférase, interagissent directement avec le CTD de l'ARN pol II et ajoutent donc la coiffe m7G sur les transcrits synthétisés par l'ARN pol II de manière co-transcriptionnelle, lorsque le transcrit naissant atteint une taille de 25 à 50 nucléotides (voir chapitre I de l'introduction). De plus, des analyses par ChIP ont montré que MePCE n'est pas détectable au promoteur de gènes transcrits par l'ARN pol II (Xue et al., 2010). Pour prouver définitivement que MePCE se lie au snARN 7SK même en l'absence de la coiffe γ -monométhyl phosphate, il faudrait vérifier que MePCE interagit avec les snARN 7SK immunoprécipités avec l'anticorps anti-m7G.

Il a été montré que MePCE est enrichie au promoteur des gènes 7SK et U6 comparativement à son niveau au promoteur de gènes transcrits par l'ARN pol II (Xue et al., 2010). De plus, le snARN 7SK présent au sein de la snRNP 7SK contenant P-TEFb possède déjà sa coiffe γ -monométhyl phosphate. Ces résultats tendent à montrer que le snARN 7SK est coiffé co-transcriptionnellement par MePCE. Néanmoins, il a été montré que la tige-boucle située à son extrémité 5' suivie d'une séquence simple brin constitue le signal d'ajout de la coiffe au snARN 7SK *in vitro*. De plus, la séquence suivant la tige-boucle située à l'extrémité 5' de l'ARN doit atteindre une taille minimale de 15 à 25 nucléotides pour un ajout de la coiffe efficace *in vitro* (Shumyatsky et al., 1994). La nécessité de ce signal particulier, retrouvé dans les snARN U6 et 7SK, suggère que MePCE coiffe le snARN 7SK co-transcriptionnellement dès lors que la première tige-boucle et la séquence simple brin suivant sont synthétisées.

Nous avons montré qu'en présence de LARP7, MePCE interagit avec le snARN 7SK même lorsque les éléments nécessaires à sa liaison sont mutés. En revanche, même en présence de MePCE, l'interaction de LARP7 avec le snARN 7SK est complètement abolie lorsque les éléments nécessaires à sa liaison sont mutés. Cela suggère que la liaison de LARP7 au snARN 7SK est essentielle pour son interaction avec MePCE. En accord avec ces résultats, il a été montré que l'assemblage du complexe stable MePCE-LARP7 est médié par le snARN 7SK et dépend des interactions LARP7-snARN 7SK et LARP7-MePCE (Barboric et al., 2009).

D'après les différentes données disponibles, on peut imaginer un modèle pour l'assemblage de la snRNP 7SK « cœur » LARP7-MePCE-7SK (figure 35). Ainsi, la protéine La, qui se localise aux promoteurs des gènes transcrits par l'ARN pol III (Fairley et al., 2005) et reconnaît l'extrémité 5'pppG des transcrits pol III naissants (Fan et al., 1998), se lie au snARN 7SK naissant. Lorsque le signal d'ajout de la coiffe constitué de la tige-boucle 5' suivie d'une séquence simple brin est synthétisé (Shumyatsky et al., 1994), de manière co-transcriptionnelle MePCE coiffe le snARN 7SK naissant puis lui reste associée (Xue et al., 2010). Bien que son interaction avec le snARN 7SK ait été déstabilisée par l'ajout de la coiffe γ -monométhyl phosphate par MePCE, la protéine La reste associée au snARN 7SK via une interaction avec son extrémité 3'-UUU-OH (Stefano, 1984). La protéine LARP7 entre alors en compétition avec la protéine La pour la liaison à l'extrémité 3' du snARN 7SK. Une fois liée au snARN 7SK (nos résultats), LARP7 peut se lier directement à MePCE et inhiber son activité catalytique (Xue et al., 2010). En retour, MePCE stabilise l'interaction de LARP7 avec le snARN 7SK (Xue et al., 2010).

-DISCUSSION-

Chapitre II : Les éléments du snARN 7SK importants pour la liaison des protéines LARP7 et MePCE

Des études menées précédemment ont montré que la diminution des quantités de LARP7 dans la cellule par ARNi entraîne une co-déplétion du snARN 7SK, soulignant le rôle de LARP7 dans le maintien de la stabilité du snARN 7SK (He et al., 2008; Krueger et al., 2008). En accord avec ce rôle essentiel de LARP7, toutes les mutations affectant la liaison de LARP7 au snARN 7SK entraînent un défaut d'accumulation de ces mutants dans les cellules HeLa (figure 4). En revanche, il a été montré que la diminution des quantités de LARP7 dans la cellule par ARNi n'affecte pas les niveaux de snARN U6 (He et al., 2008; Krueger et al., 2008). Or, confirmant les résultats obtenus par d'autres équipes (Krueger et al., 2008), nous avons montré que LARP7 s'associe spécifiquement aux snARN 7SK et U6 *in vivo*. Il se pourrait donc que la diminution des niveaux de LARP7 dans les cellules n'affecte pas les niveaux de snARN U6 parce que, comme nous l'avons montré, LARP7 ne s'associe qu'à une très faible fraction des molécules de snARN U6. On peut donc se demander pourquoi seule une très faible fraction des molécules de snARN U6 dans les cellules s'associe à LARP7 et si comme c'est le cas pour le snARN 7SK, LARP7 protège l'extrémité 3' de cette fraction des snARN U6. On peut également se demander quelle(s) est (sont) la (les) protéine(s) qui protège(nt) l'extrémité 3' de la grande majorité des molécules de snARN U6 cellulaires étant donné qu'il semblerait qu'il ne s'agisse ni de LARP7 (figure 2), ni de la protéine La qui se lie à environ 10% des molécules de snARN U6 (Terns et al., 1992).

Nos expériences de co-immunoprécipitations ont montré que MePCE s'associe spécifiquement aux snARN U6, U4 et 7SK au sein des cellules humaines. Or, contrairement aux snARN 7SK et U6, le snARN U4 ne présente pas de structure en tige-boucle à son extrémité 5' et LARP7 ne s'associe pas à cet ARN. De plus, cet ARN est synthétisé par l'ARN pol II et porte donc comme les autres snARN U synthétisés par l'ARN pol II une coiffe m7G hyperméthylée (TMG). Aucun des éléments nécessaires à la liaison de MePCE n'est retrouvé au sein du snARN U4. Nous envisageons donc que l'interaction de MePCE avec ce snARN pourrait être indirecte et liée à l'interaction de MePCE avec le snARN U6 au sein de la snRNP U4/U6. Il serait intéressant de vérifier si, comme c'est le cas pour la snRNP 7SK, MePCE joue un rôle essentiel dans la formation de la snRNP U6.

II) Recrutement de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK

LARP7 est une protéine qui s'associe spécifiquement à la quasi totalité des molécules de snARN 7SK cellulaires à travers plusieurs motifs de liaison à l'ARN. Nous avons démontré que LARP7 se lie à la tige-boucle située à l'extrémité 3' du snARN 7SK. Une analyse mutationnelle systématique du site de liaison de LARP7 sur le snARN 7SK a montré que les altérations de cet ARN, abolissant ou compromettant la liaison de LARP7, inhibaient également le recrutement de P-TEFb. L'interprétation la plus évidente pour ces résultats est que la liaison de P-TEFb au niveau de la tige-boucle 3' du snARN 7SK est médiée par son interaction avec LARP7. En accord avec ces résultats, il a été montré *in vitro* que LARP7 interagit directement avec la sous unité CDK9 de P-TEFb (Markert et al., 2008). L'interaction de P-TEFb avec LARP7 pourrait donc ne pas être une simple conséquence de la séquestration de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK, mais pourrait être activement impliquée dans le recrutement de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK. En plus de son rôle dans le maintien de la stabilité du snARN 7SK, LARP7 pourrait également jouer un rôle actif dans la séquestration de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK.

-DISCUSSION-

Chapitre II : Les éléments du snARN 7SK importants pour la liaison des protéines LARP7 et MePCE

Il sera intéressant de déterminer si l'interaction entre LARP7 et P-TEFb est effectivement essentielle pour le recrutement de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK. Pour cela, il faudra trouver des mutations de LARP7 affectant son interaction avec P-TEFb mais n'affectant pas son interaction avec le snARN 7SK. Si, dans les complexes au sein desquels cette protéine LARP7 mutée est associée, P-TEFb n'est pas recruté, cela prouvera que l'interaction entre LARP7 et P-TEFb est essentielle pour la séquestration de ce dernier au sein de la snRNP 7SK.

Si l'implication de LARP7 dans la séquestration de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK est confirmée, il sera intéressant de déterminer si des modifications post-traductionnelles de LARP7 peuvent être à l'origine de la libération de P-TEFb à partir de la snRNP 7SK dans certaines conditions, comme c'est le cas de certaines modifications post-traductionnelles de P-TEFb ou HEXIM.

Par ailleurs, étant donné que contrairement à HEXIM, LARP7 reste stablement associée au snARN 7SK après la libération de P-TEFb (Barboric et al., 2009; He et al., 2008; Krueger et al., 2008; Markert et al., 2008), il serait intéressant de déterminer si LARP7 joue un rôle actif dans la formation des autres snRNP 7SK.

Nos analyses ont permis d'identifier des éléments de la tige-boucle 3' du snARN 7SK interférant avec la liaison de P-TEFb sans affecter la liaison de LARP7. La liaison de P-TEFb requiert donc également des éléments qui ne sont pas essentiels pour la liaison de LARP7. Cela suggère que, contrairement au recrutement de P-TEFb au niveau de la tige-boucle 5' du snARN 7SK qui semble uniquement médiée par son interaction avec HEXIM (Egloff et al., 2006), la liaison de P-TEFb à la tige-boucle 3' du snARN 7SK semble nécessiter plusieurs types d'interactions intermoléculaires. Ainsi, P-TEFb pourrait être recruté à la tige-boucle 3' du snARN 7SK via une interaction directe avec LARP7 et une interaction directe ou indirecte avec la tige-boucle 3' du snARN 7SK. Il serait intéressant de déterminer si l'interaction de P-TEFb avec les éléments de la tige-boucle 3' du snARN 7SK qui ne sont pas essentiels pour la liaison de LARP7 est directe ou indirecte. En effet, cela nous permettrait de savoir si une autre protéine est impliquée dans la séquestration de P-TEFb au sein de la snRNP 7SK.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adelman, K., Wei, W., Ardehali, M.B., Werner, J., Zhu, B., Reinberg, D., and Lis, J.T. (2006). Drosophila Paf1 modulates chromatin structure at actively transcribed genes. *Molecular and cellular biology* 26, 250-260.
- Ahn, S.H., Kim, M., and Buratowski, S. (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Molecular cell* 13, 67-76.
- Aida, M., Chen, Y., Nakajima, K., Yamaguchi, Y., Wada, T., and Handa, H. (2006). Transcriptional pausing caused by NELF plays a dual role in regulating immediate-early expression of the junB gene. *Molecular and cellular biology* 26, 6094-6104.
- Ainbinder, E., Amir-Zilberstein, L., Yamaguchi, Y., Handa, H., and Dikstein, R. (2004). Elongation inhibition by DRB sensitivity-inducing factor is regulated by the A20 promoter via a novel negative element and NF-kappaB. *Molecular and cellular biology* 24, 2444-2454.
- Akhtar, A., and Becker, P.B. (2000). Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in Drosophila. *Molecular cell* 5, 367-375.
- Akhtar, A., Zink, D., and Becker, P.B. (2000). Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* 407, 405-409.
- Akhtar, M.S., Heidemann, M., Tietjen, J.R., Zhang, D.W., Chapman, R.D., Eick, D., and Ansari, A.Z. (2009). TFIIF kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Molecular cell* 34, 387-393.
- Akoulitchev, S., Chuikov, S., and Reinberg, D. (2000). TFIIF is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* 407, 102-106.
- Akoulitchev, S., Makela, T.P., Weinberg, R.A., and Reinberg, D. (1995). Requirement for TFIIF kinase activity in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 377, 557-560.
- Alarcon, C., Zaromytidou, A.I., Xi, Q., Gao, S., Yu, J., Fujisawa, S., Barlas, A., Miller, A.N., Manova-Todorova, K., Macias, M.J., *et al.* (2009). Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell* 139, 757-769.
- Alexander, R.D., Innocente, S.A., Barrass, J.D., and Beggs, J.D. (2010). Splicing-dependent RNA polymerase pausing in yeast. *Molecular cell* 40, 582-593.
- Alexandrow, M.G., and Hamlin, J.L. (2005). Chromatin decondensation in S-phase involves recruitment of Cdk2 by Cdc45 and histone H1 phosphorylation. *The Journal of cell biology* 168, 875-886.
- Allen, T.A., Von Kaenel, S., Goodrich, J.A., and Kugel, J.F. (2004). The SINE-encoded mouse B2 RNA represses mRNA transcription in response to heat shock. *Nature structural & molecular biology* 11, 816-821.
- Allison, D.S., and Hall, B.D. (1985). Effects of alterations in the 3' flanking sequence on in vivo and in vitro expression of the yeast SUP4-o tRNATyr gene. *The EMBO journal* 4, 2657-2664.
- Allison, L.A., Moyle, M., Shales, M., and Ingles, C.J. (1985). Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell* 42, 599-610.
- Ammosova, T., Jerebtsova, M., Beullens, M., Lesage, B., Jackson, A., Kashanchi, F., Southerland, W., Gordeuk, V.R., Bollen, M., and Nekhai, S. (2005). Nuclear targeting of protein phosphatase-1 by HIV-1 Tat protein. *The Journal of biological chemistry* 280, 36364-36371.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ammosova, T., Obukhov, Y., Kotelkin, A., Breuer, D., Beullens, M., Gordeuk, V.R., Bollen, M., and Nekhai, S. (2011a). Protein phosphatase-1 activates CDK9 by dephosphorylating Ser175. *PLoS one* 6, e18985.
- Ammosova, T., Yedavalli, V.R., Niu, X., Jerebtsova, M., Van Eynde, A., Beullens, M., Bollen, M., Jeang, K.T., and Nekhai, S. (2011b). Expression of a protein phosphatase 1 inhibitor, cdNIPP1, increases CDK9 threonine 186 phosphorylation and inhibits HIV-1 transcription. *The Journal of biological chemistry* 286, 3798-3804.
- Anand, K., Schulte, A., Vogel-Bachmayr, K., Scheffzek, K., and Geyer, M. (2008). Structural insights into the cyclin T1-Tat-TAR RNA transcription activation complex from EIAV. *Nature structural & molecular biology* 15, 1287-1292.
- Andrulis, E.D., Guzman, E., Doring, P., Werner, J., and Lis, J.T. (2000). High-resolution localization of *Drosophila* Spt5 and Spt6 at heat shock genes in vivo: roles in promoter proximal pausing and transcription elongation. *Genes & development* 14, 2635-2649.
- Ansari, A., and Hampsey, M. (2005). A role for the CPF 3'-end processing machinery in RNAP II-dependent gene looping. *Genes & development* 19, 2969-2978.
- Aoyagi, S., Trotter, K.W., and Archer, T.K. (2005). ATP-dependent chromatin remodeling complexes and their role in nuclear receptor-dependent transcription in vivo. *Vitamins and hormones* 70, 281-307.
- Archambault, J., Chambers, R.S., Kobor, M.S., Ho, Y., Cartier, M., Bolotin, D., Andrews, B., Kane, C.M., and Greenblatt, J. (1997). An essential component of a C-terminal domain phosphatase that interacts with transcription factor IIF in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14300-14305.
- Ardehali, M.B., Yao, J., Adelman, K., Fuda, N.J., Petesch, S.J., Webb, W.W., and Lis, J.T. (2009). Spt6 enhances the elongation rate of RNA polymerase II in vivo. *The EMBO journal* 28, 1067-1077.
- Aso, T., Haque, D., Barstead, R.J., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1996). The inducible elongin A elongation activation domain: structure, function and interaction with the elongin BC complex. *The EMBO journal* 15, 5557-5566.
- Aso, T., Lane, W.S., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (1995). Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. *Science* 269, 1439-1443.
- Augui, S., Filion, G.J., Huart, S., Nora, E., Guggiari, M., Maresca, M., Stewart, A.F., and Heard, E. (2007). Sensing X chromosome pairs before X inactivation via a novel X-pairing region of the Xic. *Science* 318, 1632-1636.
- Bai, X., Kim, J., Yang, Z., Jurynek, M.J., Akie, T.E., Lee, J., LeBlanc, J., Sessa, A., Jiang, H., DiBiase, A., *et al.* (2010). TIF1gamma controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell* 142, 133-143.
- Baillat, D., Hakimi, M.A., Naar, A.M., Shilatifard, A., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II. *Cell* 123, 265-276.
- Balamotis, M.A., Pennella, M.A., Stevens, J.L., Wasyluk, B., Belmont, A.S., and Berk, A.J. (2009). Complexity in transcription control at the activation domain-mediator interface. *Science signaling* 2, ra20.
- Barakat, T.S., Gunhanlar, N., Pardo, C.G., Achame, E.M., Ghazvini, M., Boers, R., Kenter, A., Rentmeester, E., Grootegoed, J.A., and Gribnau, J. (2011). RNF12 activates Xist and is essential for X chromosome inactivation. *PLoS genetics* 7, e1002001.
- Barboric, M., Kohoutek, J., Price, J.P., Blazek, D., Price, D.H., and Peterlin, B.M. (2005). Interplay between 7SK snRNA and oppositely charged regions in HEXIM1 direct the inhibition of P-TEFb. *The EMBO journal* 24, 4291-4303.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barboric, M., Lenasi, T., Chen, H., Johansen, E.B., Guo, S., and Peterlin, B.M. (2009). 7SK snRNP/P-TEFb couples transcription elongation with alternative splicing and is essential for vertebrate development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 7798-7803.
- Barboric, M., Nissen, R.M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N., and Peterlin, B.M. (2001). NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Molecular cell* *8*, 327-337.
- Barboric, M., and Peterlin, B.M. (2005). A new paradigm in eukaryotic biology: HIV Tat and the control of transcriptional elongation. *PLoS biology* *3*, e76.
- Barboric, M., Yik, J.H., Czudnochowski, N., Yang, Z., Chen, R., Contreras, X., Geyer, M., Matija Peterlin, B., and Zhou, Q. (2007). Tat competes with HEXIM1 to increase the active pool of P-TEFb for HIV-1 transcription. *Nucleic acids research* *35*, 2003-2012.
- Barrandon, C., Bonnet, F., Nguyen, V.T., Labas, V., and Bensaude, O. (2007). The transcription-dependent dissociation of P-TEFb-HEXIM1-7SK RNA relies upon formation of hnRNP-7SK RNA complexes. *Molecular and cellular biology* *27*, 6996-7006.
- Barrick, J.E., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Ruzzo, W.L., and Breaker, R.R. (2005). 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter. *RNA* *11*, 774-784.
- Bartkowiak, B., Liu, P., Phatnani, H.P., Fuda, N.J., Cooper, J.J., Price, D.H., Adelman, K., Lis, J.T., and Greenleaf, A.L. (2010). CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1. *Genes & development* *24*, 2303-2316.
- Bartolomei, M.S., Halden, N.F., Cullen, C.R., and Corden, J.L. (1988). Genetic analysis of the repetitive carboxyl-terminal domain of the largest subunit of mouse RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* *8*, 330-339.
- Bataille, A.R., Jeronimo, C., Jacques, P.E., Laramee, L., Fortin, M.E., Forest, A., Bergeron, M., Hanes, S.D., and Robert, F. (2012). A universal RNA polymerase II CTD cycle is orchestrated by complex interplays between kinase, phosphatase, and isomerase enzymes along genes. *Molecular cell* *45*, 158-170.
- Baugh, L.R., Demodena, J., and Sternberg, P.W. (2009). RNA Pol II accumulates at promoters of growth genes during developmental arrest. *Science* *324*, 92-94.
- Baumli, S., Lolli, G., Lowe, E.D., Troiani, S., Rusconi, L., Bullock, A.N., Debreczeni, J.E., Knapp, S., and Johnson, L.N. (2008). The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation. *The EMBO journal* *27*, 1907-1918.
- Bayfield, M.A., Yang, R., and Maraia, R.J. (2010). Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochimica et biophysica acta* *1799*, 365-378.
- Beckerman, R., Donner, A.J., Mattia, M., Peart, M.J., Manley, J.L., Espinosa, J.M., and Prives, C. (2009). A role for Chk1 in blocking transcriptional elongation of p21 RNA during the S-phase checkpoint. *Genes & development* *23*, 1364-1377.
- Belakavadi, M., and Fondell, J.D. (2010). Cyclin-dependent kinase 8 positively cooperates with Mediator to promote thyroid hormone receptor-dependent transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* *30*, 2437-2448.
- Belanger, F., Baigude, H., and Rana, T.M. (2009). U30 of 7SK RNA forms a specific photo-cross-link with Hexim1 in the context of both a minimal RNA-binding site and a fully reconstituted 7SK/Hexim1/P-TEFb ribonucleoprotein complex. *Journal of molecular biology* *386*, 1094-1107.
- Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M., and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* *301*, 1090-1093.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bengal, E., Flores, O., Krauskopf, A., Reinberg, D., and Aloni, Y. (1991). Role of the mammalian transcription factors IIF, IIS, and IIX during elongation by RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 11, 1195-1206.
- Bhattacharya, R., Perumal, K., Sinha, K., Maraiia, R., and Reddy, R. (2002). Methylphosphate cap structure in small RNAs reduces the affinity of RNAs to La protein. *Gene expression* 10, 243-253.
- Biglione, S., Byers, S.A., Price, J.P., Nguyen, V.T., Bensaude, O., Price, D.H., and Maury, W. (2007). Inhibition of HIV-1 replication by P-TEFb inhibitors DRB, seliciclib and flavopiridol correlates with release of free P-TEFb from the large, inactive form of the complex. *Retrovirology* 4, 47.
- Birse, C.E., Minvielle-Sebastia, L., Lee, B.A., Keller, W., and Proudfoot, N.J. (1998). Coupling termination of transcription to messenger RNA maturation in yeast. *Science* 280, 298-301.
- Bisgrove, D.A., Mahmoudi, T., Henklein, P., and Verdin, E. (2007). Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 13690-13695.
- Blazek, D., Barboric, M., Kohoutek, J., Oven, I., and Peterlin, B.M. (2005). Oligomerization of HEXIM1 via 7SK snRNA and coiled-coil region directs the inhibition of P-TEFb. *Nucleic acids research* 33, 7000-7010.
- Blazek, D., Kohoutek, J., Bartholomeeusen, K., Johansen, E., Hulinkova, P., Luo, Z., Cimermancic, P., Ule, J., and Peterlin, B.M. (2011). The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes & development* 25, 2158-2172.
- Blume, S.W., Meng, Z., Shrestha, K., Snyder, R.C., and Emanuel, P.D. (2003). The 5'-untranslated RNA of the human dhfr minor transcript alters transcription pre-initiation complex assembly at the major (core) promoter. *Journal of cellular biochemistry* 88, 165-180.
- Boeing, S., Rigault, C., Heidemann, M., Eick, D., and Meisterernst, M. (2010). RNA polymerase II C-terminal heptarepeat domain Ser-7 phosphorylation is established in a mediator-dependent fashion. *The Journal of biological chemistry* 285, 188-196.
- Bogenhagen, D.F., and Brown, D.D. (1981). Nucleotide sequences in *Xenopus* 5S DNA required for transcription termination. *Cell* 24, 261-270.
- Bone, J.R., Lavender, J., Richman, R., Palmer, M.J., Turner, B.M., and Kuroda, M.I. (1994). Acetylated histone H4 on the male X chromosome is associated with dosage compensation in *Drosophila*. *Genes & development* 8, 96-104.
- Borsani, G., Tonlorenzi, R., Simmler, M.C., Dandolo, L., Arnaud, D., Capra, V., Grompe, M., Pizzuti, A., Muzny, D., Lawrence, C., *et al.* (1991). Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature* 351, 325-329.
- Bortvin, A., and Winston, F. (1996). Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science* 272, 1473-1476.
- Bourgeois, C.F., Kim, Y.K., Churcher, M.J., West, M.J., and Karn, J. (2002). Spt5 cooperates with human immunodeficiency virus type 1 Tat by preventing premature RNA release at terminator sequences. *Molecular and cellular biology* 22, 1079-1093.
- Bregman, D.B., Pestell, R.G., and Kidd, V.J. (2000). Cell cycle regulation and RNA polymerase II. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 5, D244-257.
- Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G.F., Cooper, P., Smith, S., McCabe, V.M., Norris, D.P., Penny, G.D., Patel, D., and Rastan, S. (1991). Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. *Nature* 351, 329-331.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G.F., McCabe, V.M., Norris, D.P., Cooper, P.J., Swift, S., and Rastan, S. (1992). The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell* *71*, 515-526.
- Brown, C.J., Ballabio, A., Rupert, J.L., Lafreniere, R.G., Grompe, M., Tonlorenzi, R., and Willard, H.F. (1991). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* *349*, 38-44.
- Brown, C.J., Hendrich, B.D., Rupert, J.L., Lafreniere, R.G., Xing, Y., Lawrence, J., and Willard, H.F. (1992). The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* *71*, 527-542.
- Brown, S.A., Imbalzano, A.N., and Kingston, R.E. (1996). Activator-dependent regulation of transcriptional pausing on nucleosomal templates. *Genes & development* *10*, 1479-1490.
- Buratowski, S. (2005). Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Current opinion in cell biology* *17*, 257-261.
- Buratowski, S., and Sharp, P.A. (1990). Transcription initiation complexes and upstream activation with RNA polymerase II lacking the C-terminal domain of the largest subunit. *Molecular and cellular biology* *10*, 5562-5564.
- Buscaino, A., Kocher, T., Kind, J.H., Holz, H., Taipale, M., Wagner, K., Wilm, M., and Akhtar, A. (2003). MOF-regulated acetylation of MSL-3 in the Drosophila dosage compensation complex. *Molecular cell* *11*, 1265-1277.
- Bushnell, D.A., Westover, K.D., Davis, R.E., and Kornberg, R.D. (2004). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocystal at 4.5 Angstroms. *Science* *303*, 983-988.
- Byers, S.A., Price, J.P., Cooper, J.J., Li, Q., and Price, D.H. (2005). HEXIM2, a HEXIM1-related protein, regulates positive transcription elongation factor b through association with 7SK. *The Journal of biological chemistry* *280*, 16360-16367.
- Byun, J.S., Fufa, T.D., Wakano, C., Fernandez, A., Haggerty, C.M., Sung, M.H., and Gardner, K. (2012). ELL facilitates RNA polymerase II pause site entry and release. *Nature communications* *3*, 633.
- Byun, J.S., Wong, M.M., Cui, W., Idelman, G., Li, Q., De Siervi, A., Bilke, S., Haggerty, C.M., Player, A., Wang, Y.H., *et al.* (2009). Dynamic bookmarking of primary response genes by p300 and RNA polymerase II complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 19286-19291.
- Caretti, G., Lei, E.P., and Sartorelli, V. (2007). The DEAD-box p68/p72 proteins and the noncoding RNA steroid receptor activator SRA: eclectic regulators of disparate biological functions. *Cell Cycle* *6*, 1172-1176.
- Caretti, G., Schiltz, R.L., Dilworth, F.J., Di Padova, M., Zhao, P., Ogryzko, V., Fuller-Pace, F.V., Hoffman, E.P., Tapscott, S.J., and Sartorelli, V. (2006). The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. *Developmental cell* *11*, 547-560.
- Catez, F., Ueda, T., and Bustin, M. (2006). Determinants of histone H1 mobility and chromatin binding in living cells. *Nature structural & molecular biology* *13*, 305-310.
- Cavanagh, A.T., Klocko, A.D., Liu, X., and Wassarman, K.M. (2008). Promoter specificity for 6S RNA regulation of transcription is determined by core promoter sequences and competition for region 4.2 of sigma70. *Molecular microbiology* *67*, 1242-1256.
- Cavanagh, A.T., Sperger, J.M., and Wassarman, K.M. (2011). Regulation of 6S RNA by pRNA synthesis is required for efficient recovery from stationary phase in *E. coli* and *B. subtilis*. *Nucleic acids research*.
- Cavarretta, I.T., Mukopadhyay, R., Lonard, D.M., Cowser, L.M., Bennett, C.F., O'Malley, B.W., and Smith, C.L. (2002). Reduction of coactivator expression by antisense

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- oligodeoxynucleotides inhibits ERalpha transcriptional activity and MCF-7 proliferation. *Mol Endocrinol* *16*, 253-270.
- Chabot, B., Bisotto, S., and Vincent, M. (1995). The nuclear matrix phosphoprotein p255 associates with splicing complexes as part of the [U4/U6.U5] tri-snRNP particle. *Nucleic acids research* *23*, 3206-3213.
- Chadwick, B.P., and Willard, H.F. (2004). Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 17450-17455.
- Chambers, R.S., Wang, B.Q., Burton, Z.F., and Dahmus, M.E. (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. *The Journal of biological chemistry* *270*, 14962-14969.
- Chapman, R.D., Heidemann, M., Albert, T.K., Mailhammer, R., Flatley, A., Meisterernst, M., Kremmer, E., and Eick, D. (2007). Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science* *318*, 1780-1782.
- Chen, B.S., and Hampsey, M. (2004). Functional interaction between TFIIB and the Rpb2 subunit of RNA polymerase II: implications for the mechanism of transcription initiation. *Molecular and cellular biology* *24*, 3983-3991.
- Chen, R., Liu, M., Li, H., Xue, Y., Ramey, W.N., He, N., Ai, N., Luo, H., Zhu, Y., Zhou, N., *et al.* (2008). PP2B and PP1alpha cooperatively disrupt 7SK snRNP to release P-TEFb for transcription in response to Ca²⁺ signaling. *Genes & development* *22*, 1356-1368.
- Chen, R., Yang, Z., and Zhou, Q. (2004). Phosphorylated positive transcription elongation factor b (P-TEFb) is tagged for inhibition through association with 7SK snRNA. *The Journal of biological chemistry* *279*, 4153-4160.
- Chen, Y., Sinha, K., Perumal, K., Gu, J., and Reddy, R. (1998). Accurate 3' end processing and adenylation of human signal recognition particle RNA and alu RNA in vitro. *The Journal of biological chemistry* *273*, 35023-35031.
- Chen, Y., Yamaguchi, Y., Tsugeno, Y., Yamamoto, J., Yamada, T., Nakamura, M., Hisatake, K., and Handa, H. (2009). DSIF, the Paf1 complex, and Tat-SF1 have nonredundant, cooperative roles in RNA polymerase II elongation. *Genes & development* *23*, 2765-2777.
- Cheng, B., and Price, D.H. (2007). Properties of RNA polymerase II elongation complexes before and after the P-TEFb-mediated transition into productive elongation. *The Journal of biological chemistry* *282*, 21901-21912.
- Cheng, B., and Price, D.H. (2008). Analysis of factor interactions with RNA polymerase II elongation complexes using a new electrophoretic mobility shift assay. *Nucleic acids research* *36*, e135.
- Chi, Y., Huddleston, M.J., Zhang, X., Young, R.A., Annan, R.S., Carr, S.A., and Deshaies, R.J. (2001). Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes & development* *15*, 1078-1092.
- Cho, E.J., Kobor, M.S., Kim, M., Greenblatt, J., and Buratowski, S. (2001). Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes & development* *15*, 3319-3329.
- Cho, E.J., Takagi, T., Moore, C.R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes & development* *11*, 3319-3326.
- Cho, H., Kim, T.K., Mancebo, H., Lane, W.S., Flores, O., and Reinberg, D. (1999). A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes & development* *13*, 1540-1552.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cho, H., Orphanides, G., Sun, X., Yang, X.J., Ogryzko, V., Lees, E., Nakatani, Y., and Reinberg, D. (1998). A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Molecular and cellular biology* 18, 5355-5363.
- Cho, S., Schroeder, S., Kaehlcke, K., Kwon, H.S., Pedal, A., Herker, E., Schnoelzer, M., and Ott, M. (2009). Acetylation of cyclin T1 regulates the equilibrium between active and inactive P-TEFb in cells. *The EMBO journal* 28, 1407-1417.
- Cho, S., Schroeder, S., and Ott, M. (2010). CYCLING through transcription: posttranslational modifications of P-TEFb regulate transcription elongation. *Cell Cycle* 9, 1697-1705.
- Chodosh, L.A., Fire, A., Samuels, M., and Sharp, P.A. (1989). 5,6-Dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription elongation by RNA polymerase II in vitro. *The Journal of biological chemistry* 264, 2250-2257.
- Chureau, C., Chantalat, S., Romito, A., Galvani, A., Duret, L., Avner, P., and Rougeulle, C. (2011). Ftx is a non-coding RNA which affects Xist expression and chromatin structure within the X-inactivation center region. *Human molecular genetics* 20, 705-718.
- Cleynen, I., and Van de Ven, W.J. (2008). The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *International journal of oncology* 32, 289-305.
- Close, P., Hawkes, N., Cornez, I., Creppe, C., Lambert, C.A., Rogister, B., Siebenlist, U., Merville, M.P., Slaugenhaupt, S.A., Bours, V., *et al.* (2006). Transcription impairment and cell migration defects in elongator-depleted cells: implication for familial dysautonomia. *Molecular cell* 22, 521-531.
- Coleman, K.M., Lam, V., Jaber, B.M., Lanz, R.B., and Smith, C.L. (2004). SRA coactivation of estrogen receptor-alpha is phosphorylation-independent, and enhances 4-hydroxytamoxifen agonist activity. *Biochemical and biophysical research communications* 323, 332-338.
- Colley, S.M., and Leedman, P.J. (2011). Steroid Receptor RNA Activator - A nuclear receptor coregulator with multiple partners: Insights and challenges. *Biochimie* 93, 1966-1972.
- Connelly, S., and Manley, J.L. (1988). A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes & development* 2, 440-452.
- Contreras, X., Barboric, M., Lenasi, T., and Peterlin, B.M. (2007). HMBA releases P-TEFb from HEXIM1 and 7SK snRNA via PI3K/Akt and activates HIV transcription. *PLoS pathogens* 3, 1459-1469.
- Corden, J.L. (1990). Tails of RNA polymerase II. *Trends in biochemical sciences* 15, 383-387.
- Core, L.J., Waterfall, J.J., and Lis, J.T. (2008). Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322, 1845-1848.
- Corey, L.L., Weirich, C.S., Benjamin, I.J., and Kingston, R.E. (2003). Localized recruitment of a chromatin-remodeling activity by an activator in vivo drives transcriptional elongation. *Genes & development* 17, 1392-1401.
- Cozzarelli, N.R., Gerrard, S.P., Schlissel, M., Brown, D.D., and Bogenhagen, D.F. (1983). Purified RNA polymerase III accurately and efficiently terminates transcription of 5S RNA genes. *Cell* 34, 829-835.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* 292, 1863-1876.
- D'Orso, I., and Frankel, A.D. (2010). RNA-mediated displacement of an inhibitory snRNP complex activates transcription elongation. *Nature structural & molecular biology* 17, 815-821.
- Dames, S.A., Schonichen, A., Schulte, A., Barboric, M., Peterlin, B.M., Grzesiek, S., and Geyer, M. (2007). Structure of the Cyclin T binding domain of Hexim1 and molecular basis

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- for its recognition of P-TEFb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 14312-14317.
- Damgaard, C.K., Kahns, S., Lykke-Andersen, S., Nielsen, A.L., Jensen, T.H., and Kjems, J. (2008). A 5' splice site enhances the recruitment of basal transcription initiation factors in vivo. *Molecular cell* *29*, 271-278.
- David, C.J., Boyne, A.R., Millhouse, S.R., and Manley, J.L. (2011). The RNA polymerase II C-terminal domain promotes splicing activation through recruitment of a U2AF65-Prp19 complex. *Genes & development* *25*, 972-983.
- Davie, J.K., and Kane, C.M. (2000). Genetic interactions between TFIIS and the Swi-Snf chromatin-remodeling complex. *Molecular and cellular biology* *20*, 5960-5973.
- Dawson, M.A., Prinjha, R.K., Dittmann, A., Giotopoulos, G., Bantscheff, M., Chan, W.I., Robson, S.C., Chung, C.W., Hopf, C., Savitski, M.M., *et al.* (2011). Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia. *Nature* *478*, 529-533.
- De Falco, M., and De Luca, A. (2006). Involvement of cdks and cyclins in muscle differentiation. *European journal of histochemistry : EJH* *50*, 19-23.
- de la Mata, M., Alonso, C.R., Kadener, S., Fededa, J.P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., and Kornblihtt, A.R. (2003). A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Molecular cell* *12*, 525-532.
- de la Mata, M., and Kornblihtt, A.R. (2006). RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nature structural & molecular biology* *13*, 973-980.
- De Luca, A., Russo, P., Severino, A., Baldi, A., Battista, T., Cavallotti, I., De Luca, L., Baldi, F., Giordano, A., and Paggi, M.G. (2001). Pattern of expression of cyclin T1 in human tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* *49*, 685-692.
- Deblois, G., and Giguere, V. (2003). Ligand-independent coactivation of ERalpha AF-1 by steroid receptor RNA activator (SRA) via MAPK activation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *85*, 123-131.
- Deng, X., and Meller, V.H. (2006). Non-coding RNA in fly dosage compensation. *Trends in biochemical sciences* *31*, 526-532.
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T., and Ozato, K. (2003). The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 8758-8763.
- Dey, A., Ellenberg, J., Farina, A., Coleman, A.E., Maruyama, T., Sciortino, S., Lippincott-Schwartz, J., and Ozato, K. (2000). A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G(2)-to-M transition. *Molecular and cellular biology* *20*, 6537-6549.
- Dillon, S.C., Zhang, X., Trievel, R.C., and Cheng, X. (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome biology* *6*, 227.
- Dion, M.F., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Friedman, N., and Rando, O.J. (2007). Dynamics of replication-independent histone turnover in budding yeast. *Science* *315*, 1405-1408.
- Donner, A.J., Ebmeier, C.C., Taatjes, D.J., and Espinosa, J.M. (2010). CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nature structural & molecular biology* *17*, 194-201.
- Donner, A.J., Hoover, J.M., Szostek, S.A., and Espinosa, J.M. (2007a). Stimulus-specific transcriptional regulation within the p53 network. *Cell Cycle* *6*, 2594-2598.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Donner, A.J., Szostek, S., Hoover, J.M., and Espinosa, J.M. (2007b). CDK8 is a stimulus-specific positive coregulator of p53 target genes. *Molecular cell* 27, 121-133.
- Dou, Y., Milne, T.A., Tackett, A.J., Smith, E.R., Fukuda, A., Wysocka, J., Allis, C.D., Chait, B.T., Hess, J.L., and Roeder, R.G. (2005). Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* 121, 873-885.
- Dow, E.C., Liu, H., and Rice, A.P. (2010). T-loop phosphorylated Cdk9 localizes to nuclear speckle domains which may serve as sites of active P-TEFb function and exchange between the Brd4 and 7SK/HEXIM1 regulatory complexes. *Journal of cellular physiology* 224, 84-93.
- Driscoll, C.T., Darlington, G.J., and Maraia, R.J. (1994). The conserved 7SK snRNA gene localizes to human chromosome 6 by homolog exclusion probing of somatic cell hybrid RNA. *Nucleic acids research* 22, 722-725.
- Drouin, S., Laramee, L., Jacques, P.E., Forest, A., Bergeron, M., and Robert, F. (2010). DSIF and RNA polymerase II CTD phosphorylation coordinate the recruitment of Rpd3S to actively transcribed genes. *PLoS genetics* 6, e1001173.
- Dulac, C., Michels, A.A., Fraldi, A., Bonnet, F., Nguyen, V.T., Napolitano, G., Lania, L., and Bensaude, O. (2005). Transcription-dependent association of multiple positive transcription elongation factor units to a HEXIM multimer. *The Journal of biological chemistry* 280, 30619-30629.
- Dye, M.J., Gromak, N., and Proudfoot, N.J. (2006). Exon tethering in transcription by RNA polymerase II. *Molecular cell* 21, 849-859.
- Dye, M.J., and Proudfoot, N.J. (2001). Multiple transcript cleavage precedes polymerase release in termination by RNA polymerase II. *Cell* 105, 669-681.
- Dynlacht, B.D. (1997). Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature* 389, 149-152.
- Eberle, A.B., Hessle, V., Helbig, R., Dantoft, W., Gimber, N., and Visa, N. (2010). Splice-site mutations cause Rrp6-mediated nuclear retention of the unspliced RNAs and transcriptional down-regulation of the splicing-defective genes. *PloS one* 5, e11540.
- Egloff, S., O'Reilly, D., Chapman, R.D., Taylor, A., Tanzhaus, K., Pitts, L., Eick, D., and Murphy, S. (2007). Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression. *Science* 318, 1777-1779.
- Egloff, S., Szczepaniak, S.A., Dienstbier, M., Taylor, A., Knight, S., and Murphy, S. (2010). The integrator complex recognizes a new double mark on the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *The Journal of biological chemistry* 285, 20564-20569.
- Egloff, S., Van Herreweghe, E., and Kiss, T. (2006). Regulation of polymerase II transcription by 7SK snRNA: two distinct RNA elements direct P-TEFb and HEXIM1 binding. *Molecular and cellular biology* 26, 630-642.
- Egloff, S., Zaborowska, J., Laitem, C., Kiss, T., and Murphy, S. (2012). Ser7 Phosphorylation of the CTD Recruits the RPAP2 Ser5 Phosphatase to snRNA Genes. *Molecular cell* 45, 111-122.
- Eilebrecht, S., Becavin, C., Leger, H., Benecke, B.J., and Benecke, A. (2011a). HMGA1-dependent and independent 7SK RNA gene regulatory activity. *RNA biology* 8, 143-157.
- Eilebrecht, S., Benecke, B.J., and Benecke, A. (2011b). 7SK snRNA-mediated, gene-specific cooperativity of HMGA1 and P-TEFb. *RNA biology* 8, 1084-1093.
- Eilebrecht, S., Brysbaert, G., Wegert, T., Urlaub, H., Benecke, B.J., and Benecke, A. (2011c). 7SK small nuclear RNA directly affects HMGA1 function in transcription regulation. *Nucleic acids research* 39, 2057-2072.
- Eissenberg, J.C., Ma, J., Gerber, M.A., Christensen, A., Kennison, J.A., and Shilatifard, A. (2002). dELL is an essential RNA polymerase II elongation factor with a general role in

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 9894-9899.
- Eissenberg, J.C., Shilatifard, A., Dorokhov, N., and Michener, D.E. (2007). Cdk9 is an essential kinase in *Drosophila* that is required for heat shock gene expression, histone methylation and elongation factor recruitment. *Molecular genetics and genomics* : MGG *277*, 101-114.
- Elagib, K.E., Mihaylov, I.S., Delehanty, L.L., Bullock, G.C., Ouma, K.D., Caronia, J.F., Gonias, S.L., and Goldfarb, A.N. (2008). Cross-talk of GATA-1 and P-TEFb in megakaryocyte differentiation. *Blood* *112*, 4884-4894.
- Elmlund, H., Baraznenok, V., Lindahl, M., Samuelsen, C.O., Koeck, P.J., Holmberg, S., Hebert, H., and Gustafsson, C.M. (2006). The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 15788-15793.
- Erie, D.A. (2002). The many conformational states of RNA polymerase elongation complexes and their roles in the regulation of transcription. *Biochimica et biophysica acta* *1577*, 224-239.
- Espinoza, C.A., Allen, T.A., Hieb, A.R., Kugel, J.F., and Goodrich, J.A. (2004). B2 RNA binds directly to RNA polymerase II to repress transcript synthesis. *Nature structural & molecular biology* *11*, 822-829.
- Espinoza, C.A., Goodrich, J.A., and Kugel, J.F. (2007). Characterization of the structure, function, and mechanism of B2 RNA, an ncRNA repressor of RNA polymerase II transcription. *RNA* *13*, 583-596.
- Fabrega, C., Shen, V., Shuman, S., and Lima, C.D. (2003). Structure of an mRNA capping enzyme bound to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Molecular cell* *11*, 1549-1561.
- Fairley, J.A., Kantidakis, T., Kenneth, N.S., Intine, R.V., Maraia, R.J., and White, R.J. (2005). Human La is found at RNA polymerase III-transcribed genes in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 18350-18355.
- Fan, H., Goodier, J.L., Chamberlain, J.R., Engelke, D.R., and Maraia, R.J. (1998). 5' processing of tRNA precursors can be modulated by the human La antigen phosphoprotein. *Molecular and cellular biology* *18*, 3201-3211.
- Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Henry, N.L., and Kornberg, R.D. (1994). Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIF/TFIIK. *Cell* *79*, 1103-1109.
- Fenton, M.S., Lee, S.J., and Gralla, J.D. (2000). *Escherichia coli* promoter opening and -10 recognition: mutational analysis of sigma70. *The EMBO journal* *19*, 1130-1137.
- Firestein, R., Bass, A.J., Kim, S.Y., Dunn, I.F., Silver, S.J., Guney, I., Freed, E., Ligon, A.H., Vena, N., Ogino, S., *et al.* (2008). CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature* *455*, 547-551.
- Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C.D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Current opinion in cell biology* *15*, 172-183.
- Flores, O., Maldonado, E., and Reinberg, D. (1989). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Factors IIE and IIF independently interact with RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry* *264*, 8913-8921.
- Fong, N., and Bentley, D.L. (2001). Capping, splicing, and 3' processing are independently stimulated by RNA polymerase II: different functions for different segments of the CTD. *Genes & development* *15*, 1783-1795.
- Fornace, A.J., Jr., and Mitchell, J.B. (1986). Induction of B2 RNA polymerase III transcription by heat shock: enrichment for heat shock induced sequences in rodent cells by hybridization subtraction. *Nucleic acids research* *14*, 5793-5811.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fraser, N.W., Sehgal, P.B., and Darnell, J.E. (1978). DRB-induced premature termination of late adenovirus transcription. *Nature* 272, 590-593.
- Fryer, C.J., and Archer, T.K. (1998). Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature* 393, 88-91.
- Fu, J., Yoon, H.G., Qin, J., and Wong, J. (2007). Regulation of P-TEFb elongation complex activity by CDK9 acetylation. *Molecular and cellular biology* 27, 4641-4651.
- Fu, T.J., Peng, J., Lee, G., Price, D.H., and Flores, O. (1999). Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription. *The Journal of biological chemistry* 274, 34527-34530.
- Fujinaga, K., Irwin, D., Huang, Y., Taube, R., Kurosu, T., and Peterlin, B.M. (2004). Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Molecular and cellular biology* 24, 787-795.
- Furger, A., O'Sullivan, J.M., Binnie, A., Lee, B.A., and Proudfoot, N.J. (2002). Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes & development* 16, 2792-2799.
- Galatioto, J., Mascareno, E., and Siddiqui, M.A. (2010). CLP-1 associates with MyoD and HDAC to restore skeletal muscle cell regeneration. *Journal of cell science* 123, 3789-3795.
- Galbraith, M.D., Donner, A.J., and Espinosa, J.M. (2010). CDK8: a positive regulator of transcription. *Transcription* 1, 4-12.
- Garber, M.E., Wei, P., and Jones, K.A. (1998a). HIV-1 Tat interacts with cyclin T1 to direct the P-TEFb CTD kinase complex to TAR RNA. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 63, 371-380.
- Garber, M.E., Wei, P., KewalRamani, V.N., Mayall, T.P., Herrmann, C.H., Rice, A.P., Littman, D.R., and Jones, K.A. (1998b). The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein. *Genes & development* 12, 3512-3527.
- Gargano, B., Amente, S., Majello, B., and Lania, L. (2007). P-TEFb is a crucial co-factor for Myc transactivation. *Cell Cycle* 6, 2031-2037.
- Garrett, K.P., Aso, T., Bradsher, J.N., Foundling, S.I., Lane, W.S., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1995). Positive regulation of general transcription factor SIII by a tailed ubiquitin homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7172-7176.
- Garriga, J., Peng, J., Parreno, M., Price, D.H., Henderson, E.E., and Grana, X. (1998). Upregulation of cyclin T1/CDK9 complexes during T cell activation. *Oncogene* 17, 3093-3102.
- Gelbart, M.E., Larschan, E., Peng, S., Park, P.J., and Kuroda, M.I. (2009). Drosophila MSL complex globally acetylates H4K16 on the male X chromosome for dosage compensation. *Nature structural & molecular biology* 16, 825-832.
- Gerber, M., Ma, J., Dean, K., Eissenberg, J.C., and Shilatifard, A. (2001). Drosophila ELL is associated with actively elongating RNA polymerase II on transcriptionally active sites in vivo. *The EMBO journal* 20, 6104-6114.
- Gerritsen, M.E., Williams, A.J., Neish, A.S., Moore, S., Shi, Y., and Collins, T. (1997). CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2927-2932.
- Ghosh, A., Shuman, S., and Lima, C.D. (2011). Structural insights to how mammalian capping enzyme reads the CTD code. *Molecular cell* 43, 299-310.
- Giacinti, C., Bagella, L., Puri, P.L., Giordano, A., and Simone, C. (2006). MyoD recruits the cdk9/cyclin T2 complex on myogenic-genes regulatory regions. *Journal of cellular physiology* 206, 807-813.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Giacinti, C., Musaro, A., De Falco, G., Jourdan, I., Molinaro, M., Bagella, L., Simone, C., and Giordano, A. (2008). Cdk9-55: a new player in muscle regeneration. *Journal of cellular physiology* 216, 576-582.
- Gibb, E.A., Brown, C.J., and Lam, W.L. (2011). The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Molecular cancer* 10, 38.
- Gilchrist, D.A., Dos Santos, G., Fargo, D.C., Xie, B., Gao, Y., Li, L., and Adelman, K. (2010). Pausing of RNA polymerase II disrupts DNA-specified nucleosome organization to enable precise gene regulation. *Cell* 143, 540-551.
- Gilchrist, D.A., Nechaev, S., Lee, C., Ghosh, S.K., Collins, J.B., Li, L., Gilmour, D.S., and Adelman, K. (2008). NELF-mediated stalling of Pol II can enhance gene expression by blocking promoter-proximal nucleosome assembly. *Genes & development* 22, 1921-1933.
- Gildehaus, N., Neusser, T., Wurm, R., and Wagner, R. (2007). Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of in vitro transcription and synthesis of RNA-directed de novo transcripts. *Nucleic acids research* 35, 1885-1896.
- Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z.H., and Tjian, R. (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFIII110 component of the *Drosophila* TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 192-196.
- Ginsburg, D.S., Govind, C.K., and Hinnebusch, A.G. (2009). NuA4 lysine acetyltransferase Esa1 is targeted to coding regions and stimulates transcription elongation with Gcn5. *Molecular and cellular biology* 29, 6473-6487.
- Giraud, S., Hurlstone, A., Avril, S., and Coqueret, O. (2004). Implication of BRG1 and cdk9 in the STAT3-mediated activation of the p21waf1 gene. *Oncogene* 23, 7391-7398.
- Glover-Cutter, K., Larochelle, S., Erickson, B., Zhang, C., Shokat, K., Fisher, R.P., and Bentley, D.L. (2009). TFIIF-associated Cdk7 kinase functions in phosphorylation of C-terminal domain Ser7 residues, promoter-proximal pausing, and termination by RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 29, 5455-5464.
- Goodall, G.J., Wiebauer, K., and Filipowicz, W. (1990). Analysis of pre-mRNA processing in transfected plant protoplasts. *Methods in enzymology* 181, 148-161.
- Goodrich, J.A., and Kugel, J.F. (2010). Dampening DNA binding: a common mechanism of transcriptional repression for both ncRNAs and protein domains. *RNA biology* 7, 305-309.
- Govind, C.K., Qiu, H., Ginsburg, D.S., Ruan, C., Hofmeyer, K., Hu, C., Swaminathan, V., Workman, J.L., Li, B., and Hinnebusch, A.G. (2010). Phosphorylated Pol II CTD recruits multiple HDACs, including Rpd3C(S), for methylation-dependent deacetylation of ORF nucleosomes. *Molecular cell* 39, 234-246.
- Govind, C.K., Zhang, F., Qiu, H., Hofmeyer, K., and Hinnebusch, A.G. (2007). Gcn5 promotes acetylation, eviction, and methylation of nucleosomes in transcribed coding regions. *Molecular cell* 25, 31-42.
- Grana, X., De Luca, A., Sang, N., Fu, Y., Claudio, P.P., Rosenblatt, J., Morgan, D.O., and Giordano, A. (1994). PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 3834-3838.
- Gromak, N., West, S., and Proudfoot, N.J. (2006). Pause sites promote transcriptional termination of mammalian RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 26, 3986-3996.
- Gruber, J.J., Olejniczak, S.H., Yong, J., La Rocca, G., Dreyfuss, G., and Thompson, C.B. (2012). Ars2 promotes proper replication-dependent histone mRNA 3' end formation. *Molecular cell* 45, 87-98.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gu, W., Szauter, P., and Lucchesi, J.C. (1998). Targeting of MOF, a putative histone acetyl transferase, to the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Developmental genetics* 22, 56-64.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88.
- Guiguen, A., Soutourina, J., Dewez, M., Tafforeau, L., Dieu, M., Raes, M., Vandenhoute, J., Werner, M., and Hermand, D. (2007). Recruitment of P-TEFb (Cdk9-Pch1) to chromatin by the cap-methyl transferase Pcm1 in fission yeast. *The EMBO journal* 26, 1552-1559.
- Hargreaves, D.C., Horng, T., and Medzhitov, R. (2009). Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell* 138, 129-145.
- Hartzog, G.A., Wada, T., Handa, H., and Winston, F. (1998). Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* 12, 357-369.
- Hatchell, E.C., Colley, S.M., Beveridge, D.J., Epis, M.R., Stuart, L.M., Giles, K.M., Redfern, A.D., Miles, L.E., Barker, A., MacDonald, L.M., *et al.* (2006). SLIRP, a small SRA binding protein, is a nuclear receptor corepressor. *Molecular cell* 22, 657-668.
- Hayes, J.J., and Hansen, J.C. (2001). Nucleosomes and the chromatin fiber. *Current opinion in genetics & development* 11, 124-129.
- He, N., Chan, C.K., Sobhian, B., Chou, S., Xue, Y., Liu, M., Alber, T., Benkirane, M., and Zhou, Q. (2011). Human Polymerase-Associated Factor complex (PAFc) connects the Super Elongation Complex (SEC) to RNA polymerase II on chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, E636-645.
- He, N., Jahchan, N.S., Hong, E., Li, Q., Bayfield, M.A., Maraia, R.J., Luo, K., and Zhou, Q. (2008). A La-related protein modulates 7SK snRNP integrity to suppress P-TEFb-dependent transcriptional elongation and tumorigenesis. *Molecular cell* 29, 588-599.
- He, N., Liu, M., Hsu, J., Xue, Y., Chou, S., Burlingame, A., Krogan, N.J., Alber, T., and Zhou, Q. (2010). HIV-1 Tat and host AFF4 recruit two transcription elongation factors into a bifunctional complex for coordinated activation of HIV-1 transcription. *Molecular cell* 38, 428-438.
- He, N., Pezda, A.C., and Zhou, Q. (2006). Modulation of a P-TEFb functional equilibrium for the global control of cell growth and differentiation. *Molecular and cellular biology* 26, 7068-7076.
- Hendrickson, S.L., Wu, J.S., and Johnson, L.F. (1980). Cell cycle regulation of dihydrofolate reductase mRNA metabolism in mouse fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 5140-5144.
- Hengartner, C.J., Myer, V.E., Liao, S.M., Wilson, C.J., Koh, S.S., and Young, R.A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Molecular cell* 2, 43-53.
- Herrmann, C.H., Carroll, R.G., Wei, P., Jones, K.A., and Rice, A.P. (1998). Tat-associated kinase, TAK, activity is regulated by distinct mechanisms in peripheral blood lymphocytes and promonocytic cell lines. *Journal of virology* 72, 9881-9888.
- Hindley, J. (1967). Fractionation of ³²P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting. *Journal of molecular biology* 30, 125-136.
- Hirose, Y., and Manley, J.L. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes & development* 14, 1415-1429.
- Hirose, Y., Tacke, R., and Manley, J.L. (1999). Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes & development* 13, 1234-1239.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hirtreiter, A., Damsma, G.E., Cheung, A.C., Klose, D., Grohmann, D., Vojnic, E., Martin, A.C., Cramer, P., and Werner, F. (2010). Spt4/5 stimulates transcription elongation through the RNA polymerase clamp coiled-coil motif. *Nucleic acids research* 38, 4040-4051.
- Ho, C.K., and Shuman, S. (1999). Distinct roles for CTD Ser-2 and Ser-5 phosphorylation in the recruitment and allosteric activation of mammalian mRNA capping enzyme. *Molecular cell* 3, 405-411.
- Hogg, J.R., and Collins, K. (2007). RNA-based affinity purification reveals 7SK RNPs with distinct composition and regulation. *RNA* 13, 868-880.
- Holstege, F.C., Fiedler, U., and Timmers, H.T. (1997). Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *The EMBO journal* 16, 7468-7480.
- Hong, S.W., Hong, S.M., Yoo, J.W., Lee, Y.C., Kim, S., Lis, J.T., and Lee, D.K. (2009). Phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain by TFIIF kinase is not essential for transcription of *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 14276-14280.
- Hoque, M., Shamanna, R.A., Guan, D., Pe'ery, T., and Mathews, M.B. (2011). HIV-1 replication and latency are regulated by translational control of cyclin T1. *Journal of molecular biology* 410, 917-932.
- Hou, T., Ray, S., and Brasier, A.R. (2007). The functional role of an interleukin 6-inducible CDK9/STAT3 complex in human gamma-fibrinogen gene expression. *The Journal of biological chemistry* 282, 37091-37102.
- Houzelstein, D., Bullock, S.L., Lynch, D.E., Grigorieva, E.F., Wilson, V.A., and Beddington, R.S. (2002). Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4. *Molecular and cellular biology* 22, 3794-3802.
- Howe, K.J., Kane, C.M., and Ares, M., Jr. (2003). Perturbation of transcription elongation influences the fidelity of internal exon inclusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 9, 993-1006.
- Hsin, J.P., Sheth, A., and Manley, J.L. (2011). RNAP II CTD phosphorylated on threonine-4 is required for histone mRNA 3' end processing. *Science* 334, 683-686.
- Hu, D., Mayeda, A., Trembley, J.H., Lahti, J.M., and Kidd, V.J. (2003). CDK11 complexes promote pre-mRNA splicing. *The Journal of biological chemistry* 278, 8623-8629.
- Huang, F., Wagner, M., and Siddiqui, M.A. (2004). Ablation of the CLP-1 gene leads to down-regulation of the HAND1 gene and abnormality of the left ventricle of the heart and fetal death. *Mechanisms of development* 121, 559-572.
- Hube, F., Guo, J., Chooniedass-Kothari, S., Cooper, C., Hamedani, M.K., Dibrov, A.A., Blanchard, A.A., Wang, X., Deng, G., Myal, Y., *et al.* (2006). Alternative splicing of the first intron of the steroid receptor RNA activator (SRA) participates in the generation of coding and noncoding RNA isoforms in breast cancer cell lines. *DNA and cell biology* 25, 418-428.
- Hubert, J.C., Guyonvarch, A., Kammerer, B., Exinger, F., Liljelund, P., and Lacroute, F. (1983). Complete sequence of a eukaryotic regulatory gene. *The EMBO journal* 2, 2071-2073.
- Iankova, I., Petersen, R.K., Annicotte, J.S., Chavey, C., Hansen, J.B., Kratchmarova, I., Sarruf, D., Benkirane, M., Kristiansen, K., and Fajas, L. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma recruits the positive transcription elongation factor b complex to activate transcription and promote adipogenesis. *Mol Endocrinol* 20, 1494-1505.
- Ip, J.Y., Schmidt, D., Pan, Q., Ramani, A.K., Fraser, A.G., Odom, D.T., and Blencowe, B.J. (2011). Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation. *Genome research* 21, 390-401.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Isel, C., and Karn, J. (1999). Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *Journal of molecular biology* 290, 929-941.
- Ivanov, D., Kwak, Y.T., Guo, J., and Gaynor, R.B. (2000). Domains in the SPT5 protein that modulate its transcriptional regulatory properties. *Molecular and cellular biology* 20, 2970-2983.
- Ivanovska, I., Jacques, P.E., Rando, O.J., Robert, F., and Winston, F. (2011). Control of chromatin structure by spt6: different consequences in coding and regulatory regions. *Molecular and cellular biology* 31, 531-541.
- Izban, M.G., and Luse, D.S. (1992a). Factor-stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates. *The Journal of biological chemistry* 267, 13647-13655.
- Izban, M.G., and Luse, D.S. (1992b). The RNA polymerase II ternary complex cleaves the nascent transcript in a 3'----5' direction in the presence of elongation factor SII. *Genes & development* 6, 1342-1356.
- Jacquier, A. (2009). The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. *Nature reviews. Genetics* 10, 833-844.
- Jaehning, J.A. (2010). The Paf1 complex: platform or player in RNA polymerase II transcription? *Biochimica et biophysica acta* 1799, 379-388.
- Jamai, A., Imoberdorf, R.M., and Strubin, M. (2007). Continuous histone H2B and transcription-dependent histone H3 exchange in yeast cells outside of replication. *Molecular cell* 25, 345-355.
- Jang, M.K., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H.S., Brady, J.N., and Ozato, K. (2005). The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Molecular cell* 19, 523-534.
- Jeanmougin, F., Wurtz, J.M., Le Douarin, B., Chambon, P., and Losson, R. (1997). The bromodomain revisited. *Trends in biochemical sciences* 22, 151-153.
- Jeon, C., Yoon, H., and Agarwal, K. (1994). The transcription factor TFIIS zinc ribbon dipeptide Asp-Glu is critical for stimulation of elongation and RNA cleavage by RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9106-9110.
- Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Li, Q., Chua, G., Poitras, C., Therien, C., Bergeron, D., Bourassa, S., Greenblatt, J., *et al.* (2007). Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Molecular cell* 27, 262-274.
- Jonkers, I., Barakat, T.S., Achame, E.M., Monkhorst, K., Kenter, A., Rentmeester, E., Grosveld, F., Grootegoed, J.A., and Gribnau, J. (2009). RNF12 is an X-Encoded dose-dependent activator of X chromosome inactivation. *Cell* 139, 999-1011.
- Kaichi, S., Takaya, T., Morimoto, T., Sunagawa, Y., Kawamura, T., Ono, K., Shimatsu, A., Baba, S., Heike, T., Nakahata, T., *et al.* (2011). Cyclin-dependent kinase 9 forms a complex with GATA4 and is involved in the differentiation of mouse ES cells into cardiomyocytes. *Journal of cellular physiology* 226, 248-254.
- Kanazawa, S., Okamoto, T., and Peterlin, B.M. (2000). Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection. *Immunity* 12, 61-70.
- Kanazawa, S., Soucek, L., Evan, G., Okamoto, T., and Peterlin, B.M. (2003). c-Myc recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis. *Oncogene* 22, 5707-5711.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kaneko, S., Li, G., Son, J., Xu, C.F., Margueron, R., Neubert, T.A., and Reinberg, D. (2010). Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes & development* 24, 2615-2620.
- Kang, M.E., and Dahmus, M.E. (1993). RNA polymerases IIA and IIO have distinct roles during transcription from the TATA-less murine dihydrofolate reductase promoter. *The Journal of biological chemistry* 268, 25033-25040.
- Kanin, E.I., Kipp, R.T., Kung, C., Slattery, M., Viale, A., Hahn, S., Shokat, K.M., and Ansari, A.Z. (2007). Chemical inhibition of the TFIIF-associated kinase Cdk7/Kin28 does not impair global mRNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 5812-5817.
- Kaplan, C.D., Laprade, L., and Winston, F. (2003). Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. *Science* 301, 1096-1099.
- Kaplan, C.D., Morris, J.R., Wu, C., and Winston, F. (2000). Spt5 and spt6 are associated with active transcription and have characteristics of general elongation factors in *D. melanogaster*. *Genes & development* 14, 2623-2634.
- Kapoor-Vazirani, P., Kagey, J.D., Powell, D.R., and Vertino, P.M. (2008). Role of hMOF-dependent histone H4 lysine 16 acetylation in the maintenance of TMS1/ASC gene activity. *Cancer research* 68, 6810-6821.
- Kelley, D.E., Stokes, D.G., and Perry, R.P. (1999). CHD1 interacts with SSRP1 and depends on both its chromodomain and its ATPase/helicase-like domain for proper association with chromatin. *Chromosoma* 108, 10-25.
- Kim, E., Du, L., Bregman, D.B., and Warren, S.L. (1997). Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA. *The Journal of cell biology* 136, 19-28.
- Kim, H.D., Choe, J., and Seo, Y.S. (1999). The *sen1(+)* gene of *Schizosaccharomyces pombe*, a homologue of budding yeast SEN1, encodes an RNA and DNA helicase. *Biochemistry* 38, 14697-14710.
- Kim, J., Guermah, M., and Roeder, R.G. (2010). The human PAF1 complex acts in chromatin transcription elongation both independently and cooperatively with SII/TFIIS. *Cell* 140, 491-503.
- Kim, J.H., Lane, W.S., and Reinberg, D. (2002). Human Elongator facilitates RNA polymerase II transcription through chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1241-1246.
- Kim, J.L., Nikolov, D.B., and Burley, S.K. (1993). Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature* 365, 520-527.
- Kim, M., Ahn, S.H., Krogan, N.J., Greenblatt, J.F., and Buratowski, S. (2004). Transitions in RNA polymerase II elongation complexes at the 3' ends of genes. *The EMBO journal* 23, 354-364.
- Kim, M., Suh, H., Cho, E.J., and Buratowski, S. (2009). Phosphorylation of the yeast Rpb1 C-terminal domain at serines 2, 5, and 7. *The Journal of biological chemistry* 284, 26421-26426.
- Kim, T.H., Barrera, L.O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M.A., Richmond, T.A., Wu, Y., Green, R.D., and Ren, B. (2005). A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436, 876-880.
- Kim, T.K., Ebright, R.H., and Reinberg, D. (2000). Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIIH. *Science* 288, 1418-1422.
- Kim, W.Y., and Dahmus, M.E. (1989). The major late promoter of adenovirus-2 is accurately transcribed by RNA polymerases IIO, IIA, and IIB. *The Journal of biological chemistry* 264, 3169-3176.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kim, Y.J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M.H., and Kornberg, R.D. (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77, 599-608.
- Knuesel, M.T., Meyer, K.D., Bernecky, C., and Taatjes, D.J. (2009). The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function. *Genes & development* 23, 439-451.
- Kohoutek, J., Li, Q., Blazek, D., Luo, Z., Jiang, H., and Peterlin, B.M. (2009). Cyclin T2 is essential for mouse embryogenesis. *Molecular and cellular biology* 29, 3280-3285.
- Komarnitsky, P., Cho, E.J., and Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes & development* 14, 2452-2460.
- Kong, S.E., Kobor, M.S., Krogan, N.J., Somesh, B.P., Sogaard, T.M., Greenblatt, J.F., and Svejstrup, J.Q. (2005). Interaction of Fcp1 phosphatase with elongating RNA polymerase II holoenzyme, enzymatic mechanism of action, and genetic interaction with elongator. *The Journal of biological chemistry* 280, 4299-4306.
- Kornblihtt, A.R., de la Mata, M., Fededa, J.P., Munoz, M.J., and Nogues, G. (2004). Multiple links between transcription and splicing. *RNA* 10, 1489-1498.
- Kostrewa, D., Zeller, M.E., Armache, K.J., Seizl, M., Leike, K., Thomm, M., and Cramer, P. (2009). RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature* 462, 323-330.
- Kotik-Kogan, O., Valentine, E.R., Sanfelice, D., Conte, M.R., and Curry, S. (2008). Structural analysis reveals conformational plasticity in the recognition of RNA 3' ends by the human La protein. *Structure* 16, 852-862.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C., and Hampsey, M. (2004). Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Molecular cell* 14, 387-394.
- Kristjuhan, A., and Svejstrup, J.Q. (2004). Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin in vivo. *The EMBO journal* 23, 4243-4252.
- Kristjuhan, A., Walker, J., Suka, N., Grunstein, M., Roberts, D., Cairns, B.R., and Svejstrup, J.Q. (2002). Transcriptional inhibition of genes with severe histone h3 hypoacetylation in the coding region. *Molecular cell* 10, 925-933.
- Krogan, N.J., and Greenblatt, J.F. (2001). Characterization of a six-subunit holo-elongator complex required for the regulated expression of a group of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 21, 8203-8212.
- Krogan, N.J., Kim, M., Ahn, S.H., Zhong, G., Kobor, M.S., Cagney, G., Emili, A., Shilatifard, A., Buratowski, S., and Greenblatt, J.F. (2002). RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Molecular and cellular biology* 22, 6979-6992.
- Krogan, N.J., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, D.P., Beattie, B.K., Emili, A., Boone, C., *et al.* (2003). Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 23, 4207-4218.
- Krueger, B.J., Jeronimo, C., Roy, B.B., Bouchard, A., Barrandon, C., Byers, S.A., Searcey, C.E., Cooper, J.J., Bensaude, O., Cohen, E.A., *et al.* (2008). LARP7 is a stable component of the 7SK snRNP while P-TEFb, HEXIM1 and hnRNP A1 are reversibly associated. *Nucleic acids research* 36, 2219-2229.
- Krueger, B.J., Varzavand, K., Cooper, J.J., and Price, D.H. (2010). The mechanism of release of P-TEFb and HEXIM1 from the 7SK snRNP by viral and cellular activators includes a conformational change in 7SK. *PLoS one* 5, e12335.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kuehner, J.N., Pearson, E.L., and Moore, C. (2011). Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12, 283-294.
- Kugel, J.F., and Goodrich, J.A. (2000). A kinetic model for the early steps of RNA synthesis by human RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry* 275, 40483-40491.
- Kulaeva, O.I., Hsieh, F.K., and Studitsky, V.M. (2010). RNA polymerase complexes cooperate to relieve the nucleosomal barrier and evict histones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11325-11330.
- Kuo, M.H., vom Baur, E., Struhl, K., and Allis, C.D. (2000). Gcn4 activator targets Gcn5 histone acetyltransferase to specific promoters independently of transcription. *Molecular cell* 6, 1309-1320.
- Kurusu, T., Tanaka, T., Ishii, J., Matsumura, K., Sugimura, K., Nakatani, T., and Kawashima, H. (2006). Expression and function of human steroid receptor RNA activator in prostate cancer cells: role of endogenous hSRA protein in androgen receptor-mediated transcription. *Prostate cancer and prostatic diseases* 9, 173-178.
- Kwek, K.Y., Murphy, S., Furger, A., Thomas, B., O'Gorman, W., Kimura, H., Proudfoot, N.J., and Akoulitchev, A. (2002). U1 snRNA associates with TFIID and regulates transcriptional initiation. *Nature structural biology* 9, 800-805.
- Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D., and Ebright, R.H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes & development* 12, 34-44.
- Lanz, R.B., McKenna, N.J., Onate, S.A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1999). A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* 97, 17-27.
- Lanz, R.B., Razani, B., Goldberg, A.D., and O'Malley, B.W. (2002). Distinct RNA motifs are important for coactivation of steroid hormone receptors by steroid receptor RNA activator (SRA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16081-16086.
- Lebars, I., Martinez-Zapien, D., Durand, A., Coutant, J., Kieffer, B., and Dock-Bregeon, A.C. (2010). HEXIM1 targets a repeated GAUC motif in the riboregulator of transcription 7SK and promotes base pair rearrangements. *Nucleic acids research* 38, 7749-7763.
- Lee, C., Li, X., Hechmer, A., Eisen, M., Biggin, M.D., Venters, B.J., Jiang, C., Li, J., Pugh, B.F., and Gilmour, D.S. (2008). NELF and GAGA factor are linked to promoter-proximal pausing at many genes in *Drosophila*. *Molecular and cellular biology* 28, 3290-3300.
- Lee, C.A., Fournier, M.J., and Beckwith, J. (1985). *Escherichia coli* 6S RNA is not essential for growth or protein secretion. *Journal of bacteriology* 161, 1156-1161.
- Lee, C.K., Shibata, Y., Rao, B., Strahl, B.D., and Lieb, J.D. (2004). Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nature genetics* 36, 900-905.
- Lee, D.K., Duan, H.O., and Chang, C. (2001). Androgen receptor interacts with the positive elongation factor P-TEFb and enhances the efficiency of transcriptional elongation. *The Journal of biological chemistry* 276, 9978-9984.
- Lee, J.T., Davidow, L.S., and Warshawsky, D. (1999). Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nature genetics* 21, 400-404.
- Leopold, P., and O'Farrell, P.H. (1991). An evolutionarily conserved cyclin homolog from *Drosophila* rescues yeast deficient in G1 cyclins. *Cell* 66, 1207-1216.
- Leuther, K.K., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. (1996). Two-dimensional crystallography of TFIIB- and IIE-RNA polymerase II complexes: implications for start site selection and initiation complex formation. *Cell* 85, 773-779.
- Levine, M. (2011). Paused RNA polymerase II as a developmental checkpoint. *Cell* 145, 502-511.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lew, D.J., Dulic, V., and Reed, S.I. (1991). Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 66, 1197-1206.
- Leygue, E. (2007). Steroid receptor RNA activator (SRA1): unusual bifaceted gene products with suspected relevance to breast cancer. *Nuclear receptor signaling* 5, e006.
- Li, Q., Price, J.P., Byers, S.A., Cheng, D., Peng, J., and Price, D.H. (2005). Analysis of the large inactive P-TEFb complex indicates that it contains one 7SK molecule, a dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and two P-TEFb molecules containing Cdk9 phosphorylated at threonine 186. *The Journal of biological chemistry* 280, 28819-28826.
- Li, T., Spearow, J., Rubin, C.M., and Schmid, C.W. (1999). Physiological stresses increase mouse short interspersed element (SINE) RNA expression in vivo. *Gene* 239, 367-372.
- Licatalosi, D.D., Geiger, G., Minet, M., Schroeder, S., Cilli, K., McNeil, J.B., and Bentley, D.L. (2002). Functional interaction of yeast pre-mRNA 3' end processing factors with RNA polymerase II. *Molecular cell* 9, 1101-1111.
- Lin, C., Garrett, A.S., De Kumar, B., Smith, E.R., Gogol, M., Seidel, C., Krumlauf, R., and Shilatifard, A. (2011). Dynamic transcriptional events in embryonic stem cells mediated by the super elongation complex (SEC). *Genes & development* 25, 1486-1498.
- Lin, C., Smith, E.R., Takahashi, H., Lai, K.C., Martin-Brown, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, J.W., Conaway, R.C., and Shilatifard, A. (2010). AFF4, a component of the ELL/P-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras, can link transcription elongation to leukemia. *Molecular cell* 37, 429-437.
- Lin, S., Coutinho-Mansfield, G., Wang, D., Pandit, S., and Fu, X.D. (2008). The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nature structural & molecular biology* 15, 819-826.
- Liou, L.Y., Haaland, R.E., Herrmann, C.H., and Rice, A.P. (2006). Cyclin T1 but not cyclin T2a is induced by a post-transcriptional mechanism in PAMP-activated monocyte-derived macrophages. *Journal of leukocyte biology* 79, 388-396.
- Liu, C.L., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Schreiber, S.L., Friedman, N., and Rando, O.J. (2005). Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS biology* 3, e328.
- Liu, M.H., Busch, R.K., Buckley, B., and Reddy, R. (1992). Characterization of antibodies against methyl-pppN cap structure: plant U3 small nucleolar RNA is recognized by these antibodies. *Nucleic acids research* 20, 4299-4304.
- Liu, W.M., Chu, W.M., Choudary, P.V., and Schmid, C.W. (1995). Cell stress and translational inhibitors transiently increase the abundance of mammalian SINE transcripts. *Nucleic acids research* 23, 1758-1765.
- Liu, Y., Kung, C., Fishburn, J., Ansari, A.Z., Shokat, K.M., and Hahn, S. (2004). Two cyclin-dependent kinases promote RNA polymerase II transcription and formation of the scaffold complex. *Molecular and cellular biology* 24, 1721-1735.
- Liu, Y., Warfield, L., Zhang, C., Luo, J., Allen, J., Lang, W.H., Ranish, J., Shokat, K.M., and Hahn, S. (2009). Phosphorylation of the transcription elongation factor Spt5 by yeast Bur1 kinase stimulates recruitment of the PAF complex. *Molecular and cellular biology* 29, 4852-4863.
- Logan, J., Falck-Pedersen, E., Darnell, J.E., Jr., and Shenk, T. (1987). A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse beta maj-globin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 8306-8310.
- Lolli, G., Lowe, E.D., Brown, N.R., and Johnson, L.N. (2004). The crystal structure of human CDK7 and its protein recognition properties. *Structure* 12, 2067-2079.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lorch, Y., Zhang, M., and Kornberg, R.D. (1999). Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* *96*, 389-392.
- Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J.M., and Reinberg, D. (1992). Human general transcription factor IIIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* *358*, 641-645.
- Luikenhuis, S., Wutz, A., and Jaenisch, R. (2001). Antisense transcription through the Xist locus mediates Tsix function in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* *21*, 8512-8520.
- Lunde, B.M., Reichow, S.L., Kim, M., Suh, H., Leeper, T.C., Yang, F., Mutschler, H., Buratowski, S., Meinhart, A., and Varani, G. (2010). Cooperative interaction of transcription termination factors with the RNA polymerase II C-terminal domain. *Nature structural & molecular biology* *17*, 1195-1201.
- Lykke-Andersen, S., and Jensen, T.H. (2007). Overlapping pathways dictate termination of RNA polymerase II transcription. *Biochimie* *89*, 1177-1182.
- Maenner, S., Muller, M., and Becker, P.B. (2012). Roles of long, non-coding RNA in chromosome-wide transcription regulation: Lessons from two dosage compensation systems. *Biochimie*.
- Mak, W., Baxter, J., Silva, J., Newall, A.E., Otte, A.P., and Brockdorff, N. (2002). Mitotically stable association of polycomb group proteins eed and enx1 with the inactive x chromosome in trophoblast stem cells. *Current biology : CB* *12*, 1016-1020.
- Malik, S., and Roeder, R.G. (2005). Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends in biochemical sciences* *30*, 256-263.
- Mandal, S.S., Chu, C., Wada, T., Handa, H., Shatkin, A.J., and Reinberg, D. (2004). Functional interactions of RNA-capping enzyme with factors that positively and negatively regulate promoter escape by RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 7572-7577.
- Mapendano, C.K., Lykke-Andersen, S., Kjems, J., Bertrand, E., and Jensen, T.H. (2010). Crosstalk between mRNA 3' end processing and transcription initiation. *Molecular cell* *40*, 410-422.
- Marahrens, Y., Panning, B., Dausman, J., Strauss, W., and Jaenisch, R. (1997). Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes & development* *11*, 156-166.
- Marciniak, R.A., and Sharp, P.A. (1991). HIV-1 Tat protein promotes formation of more-processive elongation complexes. *The EMBO journal* *10*, 4189-4196.
- Mariner, P.D., Walters, R.D., Espinoza, C.A., Drullinger, L.F., Wagner, S.D., Kugel, J.F., and Goodrich, J.A. (2008). Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock. *Molecular cell* *29*, 499-509.
- Markert, A., Grimm, M., Martinez, J., Wiesner, J., Meyerhans, A., Meyuhas, O., Sickmann, A., and Fischer, U. (2008). The La-related protein LARP7 is a component of the 7SK ribonucleoprotein and affects transcription of cellular and viral polymerase II genes. *EMBO reports* *9*, 569-575.
- Marshall, N.F., Peng, J., Xie, Z., and Price, D.H. (1996). Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *The Journal of biological chemistry* *271*, 27176-27183.
- Marshall, N.F., and Price, D.H. (1992). Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Molecular and cellular biology* *12*, 2078-2090.
- Marshall, N.F., and Price, D.H. (1995). Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *The Journal of biological chemistry* *270*, 12335-12338.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Marshall, R.M., Salerno, D., Garriga, J., and Grana, X. (2005). Cyclin T1 expression is regulated by multiple signaling pathways and mechanisms during activation of human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 175, 6402-6411.
- Martianov, I., Ramadass, A., Serra Barros, A., Chow, N., and Akoulitchev, A. (2007). Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* 445, 666-670.
- Marz, M., Donath, A., Verstraete, N., Nguyen, V.T., Stadler, P.F., and Bensaude, O. (2009). Evolution of 7SK RNA and its protein partners in metazoa. *Molecular biology and evolution* 26, 2821-2830.
- Marzluff, W.F., Wagner, E.J., and Duronio, R.J. (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nature reviews. Genetics* 9, 843-854.
- Mason, P.B., and Struhl, K. (2003). The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation in vivo. *Molecular and cellular biology* 23, 8323-8333.
- Mason, P.B., and Struhl, K. (2005). Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo. *Molecular cell* 17, 831-840.
- Masters, J.N., and Attardi, G. (1985). Discrete human dihydrofolate reductase gene transcripts present in polysomal RNA map with their 5' ends several hundred nucleotides upstream of the main mRNA start site. *Molecular and cellular biology* 5, 493-500.
- Masui, O., Bonnet, I., Le Baccon, P., Brito, I., Pollex, T., Murphy, N., Hupe, P., Barillot, E., Belmont, A.S., and Heard, E. (2011). Live-cell chromosome dynamics and outcome of X chromosome pairing events during ES cell differentiation. *Cell* 145, 447-458.
- Max, T., Sogaard, M., and Svejstrup, J.Q. (2007). Hyperphosphorylation of the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II facilitates dissociation of its complex with mediator. *The Journal of biological chemistry* 282, 14113-14120.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S., and Bentley, D.L. (1997a). 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes & development* 11, 3306-3318.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M., and Bentley, D.L. (1997b). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385, 357-361.
- Meinhart, A., and Cramer, P. (2004). Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3'-RNA-processing factors. *Nature* 430, 223-226.
- Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S., and Cramer, P. (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes & development* 19, 1401-1415.
- Meller, V.H. (2003). Initiation of dosage compensation in *Drosophila* embryos depends on expression of the roX RNAs. *Mechanisms of development* 120, 759-767.
- Meller, V.H., and Rattner, B.P. (2002). The roX genes encode redundant male-specific lethal transcripts required for targeting of the MSL complex. *The EMBO journal* 21, 1084-1091.
- Meller, V.H., Wu, K.H., Roman, G., Kuroda, M.I., and Davis, R.L. (1997). roX1 RNA paints the X chromosome of male *Drosophila* and is regulated by the dosage compensation system. *Cell* 88, 445-457.
- Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115, 751-763.
- Michels, A.A., Fraldi, A., Li, Q., Adamson, T.E., Bonnet, F., Nguyen, V.T., Sedore, S.C., Price, J.P., Price, D.H., Lania, L., *et al.* (2004). Binding of the 7SK snRNA turns the

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor. *The EMBO journal* 23, 2608-2619.
- Michels, A.A., Nguyen, V.T., Fraldi, A., Labas, V., Edwards, M., Bonnet, F., Lania, L., and Bensaude, O. (2003). MAQ1 and 7SK RNA interact with CDK9/cyclin T complexes in a transcription-dependent manner. *Molecular and cellular biology* 23, 4859-4869.
- Min, I.M., Waterfall, J.J., Core, L.J., Munroe, R.J., Schimenti, J., and Lis, J.T. (2011). Regulating RNA polymerase pausing and transcription elongation in embryonic stem cells. *Genes & development* 25, 742-754.
- Mischo, H.E., Gomez-Gonzalez, B., Grzechnik, P., Rondon, A.G., Wei, W., Steinmetz, L., Aguilera, A., and Proudfoot, N.J. (2011). Yeast Sen1 helicase protects the genome from transcription-associated instability. *Molecular cell* 41, 21-32.
- Missra, A., and Gilmour, D.S. (2010). Interactions between DSIF (DRB sensitivity inducing factor), NELF (negative elongation factor), and the *Drosophila* RNA polymerase II transcription elongation complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11301-11306.
- Misteli, T., and Spector, D.L. (1999). RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Molecular cell* 3, 697-705.
- Mooney, R.A., and Landick, R. (1999). RNA polymerase unveiled. *Cell* 98, 687-690.
- Moreland, R.J., Hanas, J.S., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (1998). Mechanism of action of RNA polymerase II elongation factor Elongin. Maximal stimulation of elongation requires conversion of the early elongation complex to an Elongin-activable form. *The Journal of biological chemistry* 273, 26610-26617.
- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134.
- Morillon, A., Karabetsou, N., O'Sullivan, J., Kent, N., Proudfoot, N., and Mellor, J. (2003). Isw1 chromatin remodeling ATPase coordinates transcription elongation and termination by RNA polymerase II. *Cell* 115, 425-435.
- Morris, E.J., Ji, J.Y., Yang, F., Di Stefano, L., Herr, A., Moon, N.S., Kwon, E.J., Haigis, K.M., Naar, A.M., and Dyson, N.J. (2008). E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature* 455, 552-556.
- Mortillaro, M.J., Blencowe, B.J., Wei, X., Nakayasu, H., Du, L., Warren, S.L., Sharp, P.A., and Berezney, R. (1996). A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8253-8257.
- Mosley, A.L., Pattenden, S.G., Carey, M., Venkatesh, S., Gilmore, J.M., Florens, L., Workman, J.L., and Washburn, M.P. (2009). Rtr1 is a CTD phosphatase that regulates RNA polymerase II during the transition from serine 5 to serine 2 phosphorylation. *Molecular cell* 34, 168-178.
- Moteki, S., and Price, D. (2002). Functional coupling of capping and transcription of mRNA. *Molecular cell* 10, 599-609.
- Mueller, D., Garcia-Cuellar, M.P., Bach, C., Buhl, S., Maethner, E., and Slany, R.K. (2009). Misguided transcriptional elongation causes mixed lineage leukemia. *PLoS biology* 7, e1000249.
- Munoz, M.J., Perez Santangelo, M.S., Paronetto, M.P., de la Mata, M., Pelisch, F., Boireau, S., Glover-Cutter, K., Ben-Dov, C., Blaustein, M., Lozano, J.J., *et al.* (2009). DNA damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation. *Cell* 137, 708-720.
- Murray, A.W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Muse, G.W., Gilchrist, D.A., Nechaev, S., Shah, R., Parker, J.S., Grissom, S.F., Zeitlinger, J., and Adelman, K. (2007). RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nature genetics* 39, 1507-1511.
- Myers, L.C., and Kornberg, R.D. (2000). Mediator of transcriptional regulation. *Annual review of biochemistry* 69, 729-749.
- Narita, T., Yamaguchi, Y., Yano, K., Sugimoto, S., Chanarat, S., Wada, T., Kim, D.K., Hasegawa, J., Omori, M., Inukai, N., *et al.* (2003). Human transcription elongation factor NELF: identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex. *Molecular and cellular biology* 23, 1863-1873.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y., and Kingston, R.E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-487.
- Navarro, P., Chambers, I., Karwacki-Neisius, V., Chureau, C., Morey, C., Rougeulle, C., and Avner, P. (2008). Molecular coupling of Xist regulation and pluripotency. *Science* 321, 1693-1695.
- Navarro, P., Moffat, M., Mullin, N.P., and Chambers, I. (2011). The X-inactivation trans-activator Rnf12 is negatively regulated by pluripotency factors in embryonic stem cells. *Human genetics* 130, 255-264.
- Navarro, P., Pichard, S., Ciaudo, C., Avner, P., and Rougeulle, C. (2005). Tsix transcription across the Xist gene alters chromatin conformation without affecting Xist transcription: implications for X-chromosome inactivation. *Genes & development* 19, 1474-1484.
- Nechaev, S., Fargo, D.C., dos Santos, G., Liu, L., Gao, Y., and Adelman, K. (2010). Global analysis of short RNAs reveals widespread promoter-proximal stalling and arrest of Pol II in *Drosophila*. *Science* 327, 335-338.
- Nedeá, E., He, X., Kim, M., Pootoolal, J., Zhong, G., Canadien, V., Hughes, T., Buratowski, S., Moore, C.L., and Greenblatt, J. (2003). Organization and function of APT, a subcomplex of the yeast cleavage and polyadenylation factor involved in the formation of mRNA and small nucleolar RNA 3'-ends. *The Journal of biological chemistry* 278, 33000-33010.
- Nelson, C., Goto, S., Lund, K., Hung, W., and Sadowski, I. (2003). Srb10/Cdk8 regulates yeast filamentous growth by phosphorylating the transcription factor Ste12. *Nature* 421, 187-190.
- Neuman, K.C., Abbondanzieri, E.A., Landick, R., Gelles, J., and Block, S.M. (2003). Ubiquitous transcriptional pausing is independent of RNA polymerase backtracking. *Cell* 115, 437-447.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., and Struhl, K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Molecular cell* 11, 709-719.
- Nguyen, V.T., Kiss, T., Michels, A.A., and Bensaude, O. (2001). 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* 414, 322-325.
- Nigg, E.A. (1996). Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Current opinion in cell biology* 8, 312-317.
- Nojima, M., Huang, Y., Tyagi, M., Kao, H.Y., and Fujinaga, K. (2008). The positive transcription elongation factor b is an essential cofactor for the activation of transcription by myocyte enhancer factor 2. *Journal of molecular biology* 382, 275-287.
- Nonet, M., Sweetser, D., and Young, R.A. (1987). Functional redundancy and structural polymorphism in the large subunit of RNA polymerase II. *Cell* 50, 909-915.
- O'Brien, S.K., Cao, H., Nathans, R., Ali, A., and Rana, T.M. (2010). P-TEFb kinase complex phosphorylates histone H1 to regulate expression of cellular and HIV-1 genes. *The Journal of biological chemistry* 285, 29713-29720.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- O'Brien, S.K., Knight, K.L., and Rana, T.M. (2012). Phosphorylation of histone H1 by P-TEFb is a necessary step in skeletal muscle differentiation. *Journal of cellular physiology* 227, 383-389.
- O'Brien, T., Hardin, S., Greenleaf, A., and Lis, J.T. (1994). Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature* 370, 75-77.
- O'Gorman, W., Thomas, B., Kwek, K.Y., Furger, A., and Akoulitchev, A. (2005). Analysis of U1 small nuclear RNA interaction with cyclin H. *The Journal of biological chemistry* 280, 36920-36925.
- Ogawa, Y., Sun, B.K., and Lee, J.T. (2008). Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. *Science* 320, 1336-1341.
- Ohkuma, Y. (1997). Multiple functions of general transcription factors TFIIE and TFIIH in transcription: possible points of regulation by trans-acting factors. *Journal of biochemistry* 122, 481-489.
- Ohkuma, Y., Hashimoto, S., Wang, C.K., Horikoshi, M., and Roeder, R.G. (1995). Analysis of the role of TFIIE in basal transcription and TFIIH-mediated carboxy-terminal domain phosphorylation through structure-function studies of TFIIE- α . *Molecular and cellular biology* 15, 4856-4866.
- Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes & development* 10, 2657-2683.
- Orphanides, G., Wu, W.H., Lane, W.S., Hampsey, M., and Reinberg, D. (1999). The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature* 400, 284-288.
- Ott, M., Geyer, M., and Zhou, Q. (2011). The control of HIV transcription: keeping RNA polymerase II on track. *Cell host & microbe* 10, 426-435.
- Ouchida, R., Kusuhara, M., Shimizu, N., Hisada, T., Makino, Y., Morimoto, C., Handa, H., Ohsuzu, F., and Tanaka, H. (2003). Suppression of NF-kappaB-dependent gene expression by a hexamethylene bisacetamide-inducible protein HEXIM1 in human vascular smooth muscle cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 8, 95-107.
- Oven, I., Brdickova, N., Kohoutek, J., Vaupotic, T., Narat, M., and Peterlin, B.M. (2007). AIRE recruits P-TEFb for transcriptional elongation of target genes in medullary thymic epithelial cells. *Molecular and cellular biology* 27, 8815-8823.
- Pal, M., and Luse, D.S. (2003). The initiation-elongation transition: lateral mobility of RNA in RNA polymerase II complexes is greatly reduced at +8/+9 and absent by +23. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5700-5705.
- Pal, M., Ponticelli, A.S., and Luse, D.S. (2005). The role of the transcription bubble and TFIIB in promoter clearance by RNA polymerase II. *Molecular cell* 19, 101-110.
- Palermo, R.D., Webb, H.M., and West, M.J. (2011). RNA polymerase II stalling promotes nucleosome occlusion and pTEFb recruitment to drive immortalization by Epstein-Barr virus. *PLoS pathogens* 7, e1002334.
- Panning, B., and Smiley, J.R. (1994). Activation of RNA polymerase III transcription of human Alu elements by herpes simplex virus. *Virology* 202, 408-417.
- Pascual-Garcia, P., Govind, C.K., Queralt, E., Cuenca-Bono, B., Llopis, A., Chavez, S., Hinnebusch, A.G., and Rodriguez-Navarro, S. (2008). Sus1 is recruited to coding regions and functions during transcription elongation in association with SAGA and TREX2. *Genes & development* 22, 2811-2822.
- Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of molecular biology* 287, 821-828.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Peng, J., Marshall, N.F., and Price, D.H. (1998a). Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb. *The Journal of biological chemistry* 273, 13855-13860.
- Peng, J., Zhu, Y., Milton, J.T., and Price, D.H. (1998b). Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes & development* 12, 755-762.
- Penny, G.D., Kay, G.F., Sheardown, S.A., Rastan, S., and Brockdorff, N. (1996). Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 379, 131-137.
- Peterlin, B.M., and Price, D.H. (2006). Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Molecular cell* 23, 297-305.
- Phatnani, H.P., and Greenleaf, A.L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes & development* 20, 2922-2936.
- Ping, Y.H., and Rana, T.M. (1999). Tat-associated kinase (P-TEFb): a component of transcription preinitiation and elongation complexes. *The Journal of biological chemistry* 274, 7399-7404.
- Ping, Y.H., and Rana, T.M. (2001). DSIF and NELF interact with RNA polymerase II elongation complex and HIV-1 Tat stimulates P-TEFb-mediated phosphorylation of RNA polymerase II and DSIF during transcription elongation. *The Journal of biological chemistry* 276, 12951-12958.
- Pinto, I., Ware, D.E., and Hampsey, M. (1992). The yeast SUA7 gene encodes a homolog of human transcription factor TFIIB and is required for normal start site selection in vivo. *Cell* 68, 977-988.
- Pirngruber, J., Shchebet, A., and Johnsen, S.A. (2009a). Insights into the function of the human P-TEFb component CDK9 in the regulation of chromatin modifications and co-transcriptional mRNA processing. *Cell Cycle* 8, 3636-3642.
- Pirngruber, J., Shchebet, A., Schreiber, L., Shema, E., Minsky, N., Chapman, R.D., Eick, D., Aylon, Y., Oren, M., and Johnsen, S.A. (2009b). CDK9 directs H2B monoubiquitination and controls replication-dependent histone mRNA 3'-end processing. *EMBO reports* 10, 894-900.
- Plant, K.E., Dye, M.J., Lafaille, C., and Proudfoot, N.J. (2005). Strong polyadenylation and weak pausing combine to cause efficient termination of transcription in the human Ggamma-globin gene. *Molecular and cellular biology* 25, 3276-3285.
- Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Worringer, K.A., Wang, H., de la Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B., and Zhang, Y. (2003). Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 300, 131-135.
- Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., *et al.* (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122, 517-527.
- Price, D.H., Sluder, A.E., and Greenleaf, A.L. (1989). Dynamic interaction between a Drosophila transcription factor and RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 9, 1465-1475.
- Proudfoot, N. (2004). New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Current opinion in cell biology* 16, 272-278.
- Proudfoot, N.J. (1989). How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends in biochemical sciences* 14, 105-110.
- Qi, T., Tang, W., Wang, L., Zhai, L., Guo, L., and Zeng, X. (2011). G-actin participates in RNA polymerase II-dependent transcription elongation by recruiting positive transcription elongation factor b (P-TEFb). *The Journal of biological chemistry* 286, 15171-15181.
- Qiu, H., Hu, C., and Hinnebusch, A.G. (2009). Phosphorylation of the Pol II CTD by KIN28 enhances BUR1/BUR2 recruitment and Ser2 CTD phosphorylation near promoters. *Molecular cell* 33, 752-762.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rahl, P.B., Lin, C.Y., Seila, A.C., Flynn, R.A., McCuine, S., Burge, C.B., Sharp, P.A., and Young, R.A. (2010). c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 141, 432-445.
- Rao, B., Shibata, Y., Strahl, B.D., and Lieb, J.D. (2005). Dimethylation of histone H3 at lysine 36 demarcates regulatory and nonregulatory chromatin genome-wide. *Molecular and cellular biology* 25, 9447-9459.
- Rao, J.N., Neumann, L., Wenzel, S., Schweimer, K., Rosch, P., and Wohrl, B.M. (2006). Structural studies on the RNA-recognition motif of NELF E, a cellular negative transcription elongation factor involved in the regulation of HIV transcription. *The Biochemical journal* 400, 449-456.
- Reinberg, D., and Roeder, R.G. (1987). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Transcription factor IIS stimulates elongation of RNA chains. *The Journal of biological chemistry* 262, 3331-3337.
- Reinberg, D., and Sims, R.J., 3rd (2006). de FACTo nucleosome dynamics. *The Journal of biological chemistry* 281, 23297-23301.
- Reines, D., Ghanouni, P., Li, Q.Q., and Mote, J., Jr. (1992). The RNA polymerase II elongation complex. Factor-dependent transcription elongation involves nascent RNA cleavage. *The Journal of biological chemistry* 267, 15516-15522.
- Renner, D.B., Yamaguchi, Y., Wada, T., Handa, H., and Price, D.H. (2001). A highly purified RNA polymerase II elongation control system. *The Journal of biological chemistry* 276, 42601-42609.
- Reyes-Reyes, M., and Hampsey, M. (2007). Role for the Ssu72 C-terminal domain phosphatase in RNA polymerase II transcription elongation. *Molecular and cellular biology* 27, 926-936.
- Richard, P., and Manley, J.L. (2009). Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes & development* 23, 1247-1269.
- Richter, L., Bone, J.R., and Kuroda, M.I. (1996). RNA-dependent association of the *Drosophila* maleless protein with the male X chromosome. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 1, 325-336.
- Richter, S., Ping, Y.H., and Rana, T.M. (2002). TAR RNA loop: a scaffold for the assembly of a regulatory switch in HIV replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7928-7933.
- Rickert, P., Seghezzi, W., Shanahan, F., Cho, H., and Lees, E. (1996). Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. *Oncogene* 12, 2631-2640.
- Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Bruggmann, S.A., Goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., Segal, E., *et al.* (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 129, 1311-1323.
- Roberts, C.W., and Roberts, J.W. (1996). Base-specific recognition of the nontemplate strand of promoter DNA by *E. coli* RNA polymerase. *Cell* 86, 495-501.
- Roberts, G.C., Gooding, C., Mak, H.Y., Proudfoot, N.J., and Smith, C.W. (1998). Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection. *Nucleic acids research* 26, 5568-5572.
- Roberts, S.G., Choy, B., Walker, S.S., Lin, Y.S., and Green, M.R. (1995). A role for activator-mediated TFIIB recruitment in diverse aspects of transcriptional regulation. *Current biology : CB* 5, 508-516.
- Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends in biochemical sciences* 21, 327-335.
- Rondon, A.G., Gallardo, M., Garcia-Rubio, M., and Aguilera, A. (2004). Molecular evidence indicating that the yeast PAF complex is required for transcription elongation. *EMBO reports* 5, 47-53.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rondon, A.G., Mischo, H.E., and Proudfoot, N.J. (2008). Terminating transcription in yeast: whether to be a 'nerd' or a 'rat'. *Nature structural & molecular biology* *15*, 775-776.
- Roy, R., Adamczewski, J.P., Seroz, T., Vermeulen, W., Tassan, J.P., Schaeffer, L., Nigg, E.A., Hoeijmakers, J.H., and Egly, J.M. (1994). The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell* *79*, 1093-1101.
- Rudin, C.M., and Thompson, C.B. (2001). Transcriptional activation of short interspersed elements by DNA-damaging agents. *Genes, chromosomes & cancer* *30*, 64-71.
- Rufiange, A., Jacques, P.E., Bhat, W., Robert, F., and Nourani, A. (2007). Genome-wide replication-independent histone H3 exchange occurs predominantly at promoters and implicates H3 K56 acetylation and Asf1. *Molecular cell* *27*, 393-405.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nature structural biology* *3*, 696-700.
- Ryman, K., Fong, N., Bratt, E., Bentley, D.L., and Ohman, M. (2007). The C-terminal domain of RNA Pol II helps ensure that editing precedes splicing of the GluR-B transcript. *RNA* *13*, 1071-1078.
- Sabo, A., Lusic, M., Cereseto, A., and Giacca, M. (2008). Acetylation of conserved lysines in the catalytic core of cyclin-dependent kinase 9 inhibits kinase activity and regulates transcription. *Molecular and cellular biology* *28*, 2201-2212.
- Sado, T., Hoki, Y., and Sasaki, H. (2006). Tsix defective in splicing is competent to establish Xist silencing. *Development* *133*, 4925-4931.
- Saha, A., Wittmeyer, J., and Cairns, B.R. (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature reviews. Molecular cell biology* *7*, 437-447.
- Sakurai, H., and Ishihama, A. (2002). Level of the RNA polymerase II in the fission yeast stays constant but phosphorylation of its carboxyl terminal domain varies depending on the phase and rate of cell growth. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* *7*, 273-284.
- Sarge, K.D., Murphy, S.P., and Morimoto, R.I. (1993). Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Molecular and cellular biology* *13*, 1392-1407.
- Sarge, K.D., Zimarino, V., Holm, K., Wu, C., and Morimoto, R.I. (1991). Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. *Genes & development* *5*, 1902-1911.
- Saunders, A., Core, L.J., and Lis, J.T. (2006). Breaking barriers to transcription elongation. *Nature reviews. Molecular cell biology* *7*, 557-567.
- Sayed, D., Hong, C., Chen, I.Y., Lypowy, J., and Abdellatif, M. (2007). MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circulation research* *100*, 416-424.
- Schaft, D., Roguev, A., Kotovic, K.M., Shevchenko, A., Sarov, M., Neugebauer, K.M., and Stewart, A.F. (2003). The histone 3 lysine 36 methyltransferase, SET2, is involved in transcriptional elongation. *Nucleic acids research* *31*, 2475-2482.
- Schneider, R., Bannister, A.J., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C., and Kouzarides, T. (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nature cell biology* *6*, 73-77.
- Schonichen, A., Bigalke, J.M., Urbanke, C., Grzesiek, S., Dames, S.A., and Geyer, M. (2010). A flexible bipartite coiled coil structure is required for the interaction of Hexim1 with the P-TEFB subunit cyclin T1. *Biochemistry* *49*, 3083-3091.
- Schramm, L., and Hernandez, N. (2002). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes & development* *16*, 2593-2620.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Schroder, S., Cho, S., Zeng, L., Zhang, Q., Kaelcke, K., Mak, L., Lau, J., Bisgrove, D., Schnolzer, M., Verdin, E., *et al.* (2012). Two-pronged Binding with Bromodomain-containing Protein 4 Liberates Positive Transcription Elongation Factor b from Inactive Ribonucleoprotein Complexes. *The Journal of biological chemistry* 287, 1090-1099.
- Schroeder, S.C., Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D. (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes & development* 14, 2435-2440.
- Schulte, A., Czudnochowski, N., Barboric, M., Schonichen, A., Blazek, D., Peterlin, B.M., and Geyer, M. (2005). Identification of a cyclin T-binding domain in Hexim1 and biochemical analysis of its binding competition with HIV-1 Tat. *The Journal of biological chemistry* 280, 24968-24977.
- Schwabish, M.A., and Struhl, K. (2004). Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 24, 10111-10117.
- Schwartz, B.E., and Ahmad, K. (2005). Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes & development* 19, 804-814.
- Schwer, B., and Shuman, S. (2011). Deciphering the RNA polymerase II CTD code in fission yeast. *Molecular cell* 43, 311-318.
- Sedore, S.C., Byers, S.A., Biglione, S., Price, J.P., Maury, W.J., and Price, D.H. (2007). Manipulation of P-TEFb control machinery by HIV: recruitment of P-TEFb from the large form by Tat and binding of HEXIM1 to TAR. *Nucleic acids research* 35, 4347-4358.
- Sehgal, P.B., Darnell, J.E., Jr., and Tamm, I. (1976). The inhibition by DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells. *Cell* 9, 473-480.
- Sekimizu, K., Kobayashi, N., Mizuno, D., and Natori, S. (1976). Purification of a factor from Ehrlich ascites tumor cells specifically stimulating RNA polymerase II. *Biochemistry* 15, 5064-5070.
- Serizawa, H., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (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. *The Journal of biological chemistry* 269, 20750-20756.
- Serizawa, H., Makela, T.P., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Weinberg, R.A., and Young, R.A. (1995). Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIH. *Nature* 374, 280-282.
- Sessa, L., Breiling, A., Lavorgna, G., Silvestri, L., Casari, G., and Orlando, V. (2007). Noncoding RNA synthesis and loss of Polycomb group repression accompanies the colinear activation of the human HOXA cluster. *RNA* 13, 223-239.
- Shamovsky, I., Ivannikov, M., Kandel, E.S., Gershon, D., and Nudler, E. (2006). RNA-mediated response to heat shock in mammalian cells. *Nature* 440, 556-560.
- Sheridan, P.L., Mayall, T.P., Verdin, E., and Jones, K.A. (1997). Histone acetyltransferases regulate HIV-1 enhancer activity in vitro. *Genes & development* 11, 3327-3340.
- Shi, Y., Downes, M., Xie, W., Kao, H.Y., Ordentlich, P., Tsai, C.C., Hon, M., and Evans, R.M. (2001). Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation. *Genes & development* 15, 1140-1151.
- Shibata, S., and Lee, J.T. (2004). Tsix transcription- versus RNA-based mechanisms in Xist repression and epigenetic choice. *Current biology : CB* 14, 1747-1754.
- Shiekhattar, R., Mermelstein, F., Fisher, R.P., Drapkin, R., Dynlacht, B., Wessling, H.C., Morgan, D.O., and Reinberg, D. (1995). Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIH. *Nature* 374, 283-287.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Shilatifard, A. (1998). Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12, 1437-1446.
- Shilatifard, A. (2004). Transcriptional elongation control by RNA polymerase II: a new frontier. *Biochimica et biophysica acta* 1677, 79-86.
- Shilatifard, A., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2003). The RNA polymerase II elongation complex. *Annual review of biochemistry* 72, 693-715.
- Shilatifard, A., Lane, W.S., Jackson, K.W., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1996). An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene. *Science* 271, 1873-1876.
- Shimba, S., Buckley, B., Reddy, R., Kiss, T., and Filipowicz, W. (1992). Cap structure of U3 small nucleolar RNA in animal and plant cells is different. gamma-Monomethyl phosphate cap structure in plant RNA. *The Journal of biological chemistry* 267, 13772-13777.
- Shore, S.M., Byers, S.A., Dent, P., and Price, D.H. (2005). Characterization of Cdk9(55) and differential regulation of two Cdk9 isoforms. *Gene* 350, 51-58.
- Shore, S.M., Byers, S.A., Maury, W., and Price, D.H. (2003). Identification of a novel isoform of Cdk9. *Gene* 307, 175-182.
- Shuman, S. (2001). Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 66, 1-40.
- Shumyatsky, G., Shimba, S., and Reddy, R. (1994). Capping signals correspond to the 5' end in four eukaryotic small RNAs containing gamma-monomethylphosphate cap structure. *Gene expression* 4, 29-41.
- Shumyatsky, G., Wright, D., and Reddy, R. (1993). Methylphosphate cap structure increases the stability of 7SK, B2 and U6 small RNAs in *Xenopus* oocytes. *Nucleic acids research* 21, 4756-4761.
- Shumyatsky, G.P., Tillib, S.V., and Kramerov, D.A. (1990). B2 RNA and 7SK RNA, RNA polymerase III transcripts, have a cap-like structure at their 5' end. *Nucleic acids research* 18, 6347-6351.
- Sidorenkov, I., Komissarova, N., and Kashlev, M. (1998). Crucial role of the RNA:DNA hybrid in the processivity of transcription. *Molecular cell* 2, 55-64.
- Sigurdsson, S., Dirac-Svejstrup, A.B., and Svejstrup, J.Q. (2010). Evidence that transcript cleavage is essential for RNA polymerase II transcription and cell viability. *Molecular cell* 38, 202-210.
- Silva, J., Mak, W., Zvetkova, I., Appanah, R., Nesterova, T.B., Webster, Z., Peters, A.H., Jenuwein, T., Otte, A.P., and Brockdorff, N. (2003). Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Developmental cell* 4, 481-495.
- Simic, R., Lindstrom, D.L., Tran, H.G., Roinick, K.L., Costa, P.J., Johnson, A.D., Hartzog, G.A., and Arndt, K.M. (2003). Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *The EMBO journal* 22, 1846-1856.
- Simone, C., Stiegler, P., Bagella, L., Pucci, B., Bellan, C., De Falco, G., De Luca, A., Guanti, G., Puri, P.L., and Giordano, A. (2002). Activation of MyoD-dependent transcription by cdk9/cyclin T2. *Oncogene* 21, 4137-4148.
- Sims, R.J., 3rd, Chen, C.F., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T., Patel, S.S., and Reinberg, D. (2005). Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *The Journal of biological chemistry* 280, 41789-41792.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sims, R.J., 3rd, Rojas, L.A., Beck, D., Bonasio, R., Schuller, R., Drury, W.J., 3rd, Eick, D., and Reinberg, D. (2011). The C-terminal domain of RNA polymerase II is modified by site-specific methylation. *Science* 332, 99-103.
- Sinha, K.M., Gu, J., Chen, Y., and Reddy, R. (1998). Adenylation of small RNAs in human cells. Development of a cell-free system for accurate adenylation on the 3'-end of human signal recognition particle RNA. *The Journal of biological chemistry* 273, 6853-6859.
- Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N.J., and Gromak, N. (2011). Human senataxin resolves RNA/DNA hybrids formed at transcriptional pause sites to promote Xrn2-dependent termination. *Molecular cell* 42, 794-805.
- Smith, E.R., Winter, B., Eissenberg, J.C., and Shilatifard, A. (2008). Regulation of the transcriptional activity of poised RNA polymerase II by the elongation factor ELL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 8575-8579.
- Sobhian, B., Laguette, N., Yatim, A., Nakamura, M., Levy, Y., Kiernan, R., and Benkirane, M. (2010). HIV-1 Tat assembles a multifunctional transcription elongation complex and stably associates with the 7SK snRNP. *Molecular cell* 38, 439-451.
- Stefano, J.E. (1984). Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* 36, 145-154.
- Steinmetz, E.J., and Brow, D.A. (1996). Repression of gene expression by an exogenous sequence element acting in concert with a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein, Nrd1, and the putative helicase Sen1. *Molecular and cellular biology* 16, 6993-7003.
- Steinmetz, E.J., Conrad, N.K., Brow, D.A., and Corden, J.L. (2001). RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts. *Nature* 413, 327-331.
- Steinmetz, E.J., Warren, C.L., Kuehner, J.N., Panbehi, B., Ansari, A.Z., and Brow, D.A. (2006). Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase. *Molecular cell* 24, 735-746.
- Stokes, D.G., Tartof, K.D., and Perry, R.P. (1996). CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of *Drosophila* polytene chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7137-7142.
- Sullivan, E.K., Weirich, C.S., Guyon, J.R., Sif, S., and Kingston, R.E. (2001). Transcriptional activation domains of human heat shock factor 1 recruit human SWI/SNF. *Molecular and cellular biology* 21, 5826-5837.
- Sun, B.K., Deaton, A.M., and Lee, J.T. (2006). A transient heterochromatic state in Xist preempts X inactivation choice without RNA stabilization. *Molecular cell* 21, 617-628.
- Sung, T.L., and Rice, A.P. (2006). Effects of prostratin on Cyclin T1/P-TEFb function and the gene expression profile in primary resting CD4+ T cells. *Retrovirology* 3, 66.
- Sung, T.L., and Rice, A.P. (2009). miR-198 inhibits HIV-1 gene expression and replication in monocytes and its mechanism of action appears to involve repression of cyclin T1. *PLoS pathogens* 5, e1000263.
- Suraweera, A., Lim, Y., Woods, R., Birrell, G.W., Nasim, T., Becherel, O.J., and Lavin, M.F. (2009). Functional role for senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, in transcriptional regulation. *Human molecular genetics* 18, 3384-3396.
- Svejstrup, J.Q., Li, Y., Fellows, J., Gnatt, A., Bjorklund, S., and Kornberg, R.D. (1997). Evidence for a mediator cycle at the initiation of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6075-6078.
- Taatjes, D.J. (2010). The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends in biochemical sciences* 35, 315-322.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Takagi, Y., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (1995). A novel activity associated with RNA polymerase II elongation factor SIII. SIII directs promoter-independent transcription initiation by RNA polymerase II in the absence of initiation factors. *The Journal of biological chemistry* 270, 24300-24305.
- Takagi, Y., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1996). Characterization of elongin C functional domains required for interaction with elongin B and activation of elongin A. *The Journal of biological chemistry* 271, 25562-25568.
- Takahashi, H., Parmely, T.J., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Banks, C.A., Kong, S.E., Szutorisz, H., Swanson, S.K., Martin-Brown, S., Washburn, M.P., *et al.* (2011). Human mediator subunit MED26 functions as a docking site for transcription elongation factors. *Cell* 146, 92-104.
- Takaya, T., Ono, K., Kawamura, T., Takanabe, R., Kaichi, S., Morimoto, T., Wada, H., Kita, T., Shimatsu, A., and Hasegawa, K. (2009). MicroRNA-1 and MicroRNA-133 in spontaneous myocardial differentiation of mouse embryonic stem cells. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 73, 1492-1497.
- Tan, S., Aso, T., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1994). Roles for both the RAP30 and RAP74 subunits of transcription factor IIF in transcription initiation and elongation by RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry* 269, 25684-25691.
- Tarricone, C., Dhavan, R., Peng, J., Areces, L.B., Tsai, L.H., and Musacchio, A. (2001). Structure and regulation of the CDK5-p25(ncf5a) complex. *Molecular cell* 8, 657-669.
- Tassan, J.P., Schultz, S.J., Bartek, J., and Nigg, E.A. (1994). Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *The Journal of cell biology* 127, 467-478.
- Taube, R., Lin, X., Irwin, D., Fujinaga, K., and Peterlin, B.M. (2002). Interaction between P-TEFb and the C-terminal domain of RNA polymerase II activates transcriptional elongation from sites upstream or downstream of target genes. *Molecular and cellular biology* 22, 321-331.
- Teng, Y., Wang, Y., Fu, J., Cheng, X., Miao, S., and Wang, L. (2011). Cyclin T2: a novel miR-15a target gene involved in early spermatogenesis. *FEBS letters* 585, 2493-2500.
- Teplova, M., Yuan, Y.R., Phan, A.T., Malinina, L., Ilin, S., Teplov, A., and Patel, D.J. (2006). Structural basis for recognition and sequestration of UUU(OH) 3' termini of nascent RNA polymerase III transcripts by La, a rheumatic disease autoantigen. *Molecular cell* 21, 75-85.
- Terns, M.P., Lund, E., and Dahlberg, J.E. (1992). 3'-end-dependent formation of U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in *Xenopus laevis* oocyte nuclei. *Molecular and cellular biology* 12, 3032-3040.
- Thiriet, C., and Hayes, J.J. (2005). Replication-independent core histone dynamics at transcriptionally active loci in vivo. *Genes & development* 19, 677-682.
- Tian, D., Sun, S., and Lee, J.T. (2010). The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell* 143, 390-403.
- Tian, Y., Ke, S., Chen, M., and Sheng, T. (2003). Interactions between the aryl hydrocarbon receptor and P-TEFb. Sequential recruitment of transcription factors and differential phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II at *cypl1* promoter. *The Journal of biological chemistry* 278, 44041-44048.
- Tietjen, J.R., Zhang, D.W., Rodriguez-Molina, J.B., White, B.E., Akhtar, M.S., Heidemann, M., Li, X., Chapman, R.D., Shokat, K., Keles, S., *et al.* (2010). Chemical-genomic dissection of the CTD code. *Nature structural & molecular biology* 17, 1154-1161.
- Tran, H.G., Steger, D.J., Iyer, V.R., and Johnson, A.D. (2000). The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *The EMBO journal* 19, 2323-2331.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Tremethick, D.J. (2007). Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell* 128, 651-654.
- Trotochaud, A.E., and Wassarman, K.M. (2004). 6S RNA function enhances long-term cell survival. *Journal of bacteriology* 186, 4978-4985.
- Trotochaud, A.E., and Wassarman, K.M. (2005). A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nature structural & molecular biology* 12, 313-319.
- Trotochaud, A.E., and Wassarman, K.M. (2006). 6S RNA regulation of *pspF* transcription leads to altered cell survival at high pH. *Journal of bacteriology* 188, 3936-3943.
- Trotter, K.W., and Archer, T.K. (2007). Nuclear receptors and chromatin remodeling machinery. *Molecular and cellular endocrinology* 265-266, 162-167.
- Tsai, M.C., Manor, O., Wan, Y., Mosammaparast, N., Wang, J.K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., and Chang, H.Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 329, 689-693.
- Turano, M., Napolitano, G., Dulac, C., Majello, B., Bensaude, O., and Lania, L. (2006). Increased HEXIM1 expression during erythroleukemia and neuroblastoma cell differentiation. *Journal of cellular physiology* 206, 603-610.
- Turner, B.M., Birley, A.J., and Lavender, J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* 69, 375-384.
- Tyagi, M., Pearson, R.J., and Karn, J. (2010). Establishment of HIV latency in primary CD4+ cells is due to epigenetic transcriptional silencing and P-TEFb restriction. *Journal of virology* 84, 6425-6437.
- Uptain, S.M., Kane, C.M., and Chamberlin, M.J. (1997). Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annual review of biochemistry* 66, 117-172.
- Van Herreweghe, E., Egloff, S., Goiffon, I., Jady, B.E., Froment, C., Monsarrat, B., and Kiss, T. (2007). Dynamic remodelling of human 7SK snRNP controls the nuclear level of active P-TEFb. *The EMBO journal* 26, 3570-3580.
- Van Lint, C., Emiliani, S., Ott, M., and Verdin, E. (1996). Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *The EMBO journal* 15, 1112-1120.
- Vermeulen, M., Mulder, K.W., Denissov, S., Pijnappel, W.W., van Schaik, F.M., Varier, R.A., Baltissen, M.P., Stunnenberg, H.G., Mann, M., and Timmers, H.T. (2007). Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* 131, 58-69.
- Vincent, M., Lauriault, P., Dubois, M.F., Lavoie, S., Bensaude, O., and Chabot, B. (1996). The nuclear matrix protein p255 is a highly phosphorylated form of RNA polymerase II largest subunit which associates with spliceosomes. *Nucleic acids research* 24, 4649-4652.
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F., *et al.* (1998a). DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes & development* 12, 343-356.
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, D., and Handa, H. (1998b). Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *The EMBO journal* 17, 7395-7403.
- Wang, Y., Dow, E.C., Liang, Y.Y., Ramakrishnan, R., Liu, H., Sung, T.L., Lin, X., and Rice, A.P. (2008). Phosphatase PPM1A regulates phosphorylation of Thr-186 in the Cdk9 T-loop. *The Journal of biological chemistry* 283, 33578-33584.
- Wassarman, D.A., and Steitz, J.A. (1991). Structural analyses of the 7SK ribonucleoprotein (RNP), the most abundant human small RNP of unknown function. *Molecular and cellular biology* 11, 3432-3445.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wassarman, K.M. (2007). 6S RNA: a regulator of transcription. *Molecular microbiology* 65, 1425-1431.
- Wassarman, K.M., and Saecker, R.M. (2006). Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. *Science* 314, 1601-1603.
- Wassarman, K.M., and Storz, G. (2000). 6S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity. *Cell* 101, 613-623.
- Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Ogawa, S., Arao, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Yano, T., Yoshikawa, H., *et al.* (2001). A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *The EMBO journal* 20, 1341-1352.
- Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H., and Jones, K.A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92, 451-462.
- West, M.J., Lowe, A.D., and Karn, J. (2001). Activation of human immunodeficiency virus transcription in T cells revisited: NF-kappaB p65 stimulates transcriptional elongation. *Journal of virology* 75, 8524-8537.
- West, S., and Proudfoot, N.J. (2009). Transcriptional termination enhances protein expression in human cells. *Molecular cell* 33, 354-364.
- West, S., Proudfoot, N.J., and Dye, M.J. (2008). Molecular dissection of mammalian RNA polymerase II transcriptional termination. *Molecular cell* 29, 600-610.
- Westwood, J.T., and Wu, C. (1993). Activation of Drosophila heat shock factor: conformational change associated with a monomer-to-trimer transition. *Molecular and cellular biology* 13, 3481-3486.
- Whitelaw, E., and Proudfoot, N. (1986). Alpha-thalassaemia caused by a poly(A) site mutation reveals that transcriptional termination is linked to 3' end processing in the human alpha 2 globin gene. *The EMBO journal* 5, 2915-2922.
- Wilson, C.J., Chao, D.M., Imbalzano, A.N., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E., and Young, R.A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84, 235-244.
- Wimmer, J., Fujinaga, K., Taube, R., Cujec, T.P., Zhu, Y., Peng, J., Price, D.H., and Peterlin, B.M. (1999). Interactions between Tat and TAR and human immunodeficiency virus replication are facilitated by human cyclin T1 but not cyclins T2a or T2b. *Virology* 255, 182-189.
- Winkler, G.S., Kristjuhan, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (2002). Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3517-3522.
- Wirbelauer, C., Bell, O., and Schubeler, D. (2005). Variant histone H3.3 is deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes while active histone modifications show a promoter-proximal bias. *Genes & development* 19, 1761-1766.
- Wolffe, A.P. (1998). Packaging principle: how DNA methylation and histone acetylation control the transcriptional activity of chromatin. *The Journal of experimental zoology* 282, 239-244.
- Wolffe, A.P. (2001). Transcriptional regulation in the context of chromatin structure. *Essays in biochemistry* 37, 45-57.
- Wu, C.H., Yamaguchi, Y., Benjamin, L.R., Horvat-Gordon, M., Washinsky, J., Enerly, E., Larsson, J., Lambertsson, A., Handa, H., and Gilmour, D. (2003a). NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in Drosophila. *Genes & development* 17, 1402-1414.

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wu, S.Y., Zhou, T., and Chiang, C.M. (2003b). Human mediator enhances activator-facilitated recruitment of RNA polymerase II and promoter recognition by TATA-binding protein (TBP) independently of TBP-associated factors. *Molecular and cellular biology* 23, 6229-6242.
- Wurm, R., Neusser, T., and Wagner, R. (2010). 6S RNA-dependent inhibition of RNA polymerase is released by RNA-dependent synthesis of small de novo products. *Biological chemistry* 391, 187-196.
- Xu, B., and Koenig, R.J. (2004). An RNA-binding domain in the thyroid hormone receptor enhances transcriptional activation. *The Journal of biological chemistry* 279, 33051-33056.
- Xu, B., Yang, W.H., Gerin, I., Hu, C.D., Hammer, G.D., and Koenig, R.J. (2009). Dax-1 and steroid receptor RNA activator (SRA) function as transcriptional coactivators for steroidogenic factor 1 in steroidogenesis. *Molecular and cellular biology* 29, 1719-1734.
- Xue, Y., Yang, Z., Chen, R., and Zhou, Q. (2010). A capping-independent function of MePCE in stabilizing 7SK snRNA and facilitating the assembly of 7SK snRNP. *Nucleic acids research* 38, 360-369.
- Yakovchuk, P., Goodrich, J.A., and Kugel, J.F. (2009). B2 RNA and Alu RNA repress transcription by disrupting contacts between RNA polymerase II and promoter DNA within assembled complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5569-5574.
- Yakovchuk, P., Goodrich, J.A., and Kugel, J.F. (2011). B2 RNA represses TFIIF phosphorylation of RNA polymerase II. *Transcription* 2, 45-49.
- Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Okamoto, S., Mura, T., and Handa, H. (2006). P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Molecular cell* 21, 227-237.
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999). NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* 97, 41-51.
- Yang, Z., Yik, J.H., Chen, R., He, N., Jang, M.K., Ozato, K., and Zhou, Q. (2005). Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Molecular cell* 19, 535-545.
- Yang, Z., Zhu, Q., Luo, K., and Zhou, Q. (2001). The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature* 414, 317-322.
- Yankulov, K.Y., and Bentley, D.L. (1997). Regulation of CDK7 substrate specificity by MAT1 and TFIIF. *The EMBO journal* 16, 1638-1646.
- Yao, H., Brick, K., Evrard, Y., Xiao, T., Camerini-Otero, R.D., and Felsenfeld, G. (2010). Mediation of CTCF transcriptional insulation by DEAD-box RNA-binding protein p68 and steroid receptor RNA activator SRA. *Genes & development* 24, 2543-2555.
- Yedavalli, V.S., Benkirane, M., and Jeang, K.T. (2003). Tat and trans-activation-responsive (TAR) RNA-independent induction of HIV-1 long terminal repeat by human and murine cyclin T1 requires Sp1. *The Journal of biological chemistry* 278, 6404-6410.
- Yik, J.H., Chen, R., Nishimura, R., Jennings, J.L., Link, A.J., and Zhou, Q. (2003). Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Molecular cell* 12, 971-982.
- Yik, J.H., Chen, R., Pezda, A.C., Samford, C.S., and Zhou, Q. (2004). A human immunodeficiency virus type 1 Tat-like arginine-rich RNA-binding domain is essential for HEXIM1 to inhibit RNA polymerase II transcription through 7SK snRNA-mediated inactivation of P-TEFb. *Molecular and cellular biology* 24, 5094-5105.
- Yik, J.H., Chen, R., Pezda, A.C., and Zhou, Q. (2005). Compensatory contributions of HEXIM1 and HEXIM2 in maintaining the balance of active and inactive positive

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- transcription elongation factor b complexes for control of transcription. *The Journal of biological chemistry* 280, 16368-16376.
- Yokoyama, A., Lin, M., Naresh, A., Kitabayashi, I., and Cleary, M.L. (2010). A higher-order complex containing AF4 and ENL family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription. *Cancer cell* 17, 198-212.
- Yonaha, M., and Proudfoot, N.J. (2000). Transcriptional termination and coupled polyadenylation in vitro. *The EMBO journal* 19, 3770-3777.
- Yu, W., Ramakrishnan, R., Wang, Y., Chiang, K., Sung, T.L., and Rice, A.P. (2008). Cyclin T1-dependent genes in activated CD4 T and macrophage cell lines appear enriched in HIV-1 co-factors. *PloS one* 3, e3146.
- Yu, W., Wang, Y., Shaw, C.A., Qin, X.F., and Rice, A.P. (2006). Induction of the HIV-1 Tat co-factor cyclin T1 during monocyte differentiation is required for the regulated expression of a large portion of cellular mRNAs. *Retrovirology* 3, 32.
- Yudkovsky, N., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408, 225-229.
- Zawel, L., Kumar, K.P., and Reinberg, D. (1995). Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes & development* 9, 1479-1490.
- Zehring, W.A., Lee, J.M., Weeks, J.R., Jokerst, R.S., and Greenleaf, A.L. (1988). The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential in vivo but is not required for accurate transcription initiation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 3698-3702.
- Zeitlinger, J., Stark, A., Kellis, M., Hong, J.W., Nechaev, S., Adelman, K., Levine, M., and Young, R.A. (2007). RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nature genetics* 39, 1512-1516.
- Zeng, C., and Berget, S.M. (2000). Participation of the C-terminal domain of RNA polymerase II in exon definition during pre-mRNA splicing. *Molecular and cellular biology* 20, 8290-8301.
- Zeng, L., and Zhou, M.M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS letters* 513, 124-128.
- Zhang, D.W., Mosley, A.L., Ramisetty, S.R., Rodriguez-Molina, J.B., Washburn, M.P., and Ansari, A.Z. (2012). Ssu72 Phosphatase-dependent Erasure of Phospho-Ser7 Marks on the RNA Polymerase II C-terminal Domain Is Essential for Viability and Transcription Termination. *The Journal of biological chemistry* 287, 8541-8551.
- Zhang, F., Barboric, M., Blackwell, T.K., and Peterlin, B.M. (2003). A model of repression: CTD analogs and PIE-1 inhibit transcriptional elongation by P-TEFb. *Genes & development* 17, 748-758.
- Zhang, J., Tamilarasu, N., Hwang, S., Garber, M.E., Huq, I., Jones, K.A., and Rana, T.M. (2000). HIV-1 TAR RNA enhances the interaction between Tat and cyclin T1. *The Journal of biological chemistry* 275, 34314-34319.
- Zhang, Y., Kim, Y., Genoud, N., Gao, J., Kelly, J.W., Pfaff, S.L., Gill, G.N., Dixon, J.E., and Noel, J.P. (2006). Determinants for dephosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain by Scp1. *Molecular cell* 24, 759-770.
- Zhao, J., Herrera-Diaz, J., and Gross, D.S. (2005a). Domain-wide displacement of histones by activated heat shock factor occurs independently of Swi/Snf and is not correlated with RNA polymerase II density. *Molecular and cellular biology* 25, 8985-8999.
- Zhao, J., Sun, B.K., Erwin, J.A., Song, J.J., and Lee, J.T. (2008). Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science* 322, 750-756.
- Zhao, X., Patton, J.R., Davis, S.L., Florence, B., Ames, S.J., and Spanjaard, R.A. (2004). Regulation of nuclear receptor activity by a pseudouridine synthase through

-DISCUSSION-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- posttranscriptional modification of steroid receptor RNA activator. *Molecular cell* 15, 549-558.
- Zhao, X., Patton, J.R., Ghosh, S.K., Fischel-Ghodsian, N., Shen, L., and Spanjaard, R.A. (2007). Pus3p- and Pus1p-dependent pseudouridylation of steroid receptor RNA activator controls a functional switch that regulates nuclear receptor signaling. *Mol Endocrinol* 21, 686-699.
- Zhao, Y., Samal, E., and Srivastava, D. (2005b). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436, 214-220.
- Zhou, M., Huang, K., Jung, K.J., Cho, W.K., Klase, Z., Kashanchi, F., Pise-Masison, C.A., and Brady, J.N. (2009). Bromodomain protein Brd4 regulates human immunodeficiency virus transcription through phosphorylation of CDK9 at threonine 29. *Journal of virology* 83, 1036-1044.
- Zhou, M., Nekhai, S., Bharucha, D.C., Kumar, A., Ge, H., Price, D.H., Egly, J.M., and Brady, J.N. (2001). TFIIH inhibits CDK9 phosphorylation during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *The Journal of biological chemistry* 276, 44633-44640.
- Zhou, Q., and Yik, J.H. (2006). The Yin and Yang of P-TEFb regulation: implications for human immunodeficiency virus gene expression and global control of cell growth and differentiation. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 70, 646-659.
- Zieve, G., and Penman, S. (1976). Small RNA species of the HeLa cell: metabolism and subcellular localization. *Cell* 8, 19-31.
- Zumer, K., Plemenitas, A., Saksela, K., and Peterlin, B.M. (2011). Patient mutation in AIRE disrupts P-TEFb binding and target gene transcription. *Nucleic acids research* 39, 7908-7919.