



**HAL**  
open science

# Caractérisation de la régulation de la transcription par l'ARN polymérase III chez *Saccharomyces cerevisiae*

Arounie Tavenet

► **To cite this version:**

Arounie Tavenet. Caractérisation de la régulation de la transcription par l'ARN polymérase III chez *Saccharomyces cerevisiae*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112227 . tel-00643755

**HAL Id: tel-00643755**

**<https://theses.hal.science/tel-00643755>**

Submitted on 22 Nov 2011

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

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



Gènes, Génomes, Cellules



UNIVERSITÉ  
PARIS-SUD 11

UNIVERSITE PARIS-SUD 11  
ECOLE DOCTORALE *GENES, GENOMES, CELLULES*

**Thèse de biologie moléculaire et génétique**

présentée par

**Arounie TAVENET**

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris-Sud11

Sujet :

**Caractérisation de la régulation de la transcription par l'ARN polymérase III chez**

***Saccharomyces cerevisiae***

Thèse soutenue le 10 novembre 2011 devant le jury composé de :

Frédéric DEVAUX  
Martin TEICHMANN  
Daniel GAUTHERET  
Antonin MORILLON  
Pascale LESAGE  
Joël ACKER

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse





---

# Remerciements

---

J'adresse mes premiers remerciements à Jean-Marc Grognet et Maïté Paternostre, respectivement Chef de l'Institut de Biologie et de Technologies de Saclay et Adjointe du Chef de l'Institut, pour m'avoir permis de finir au mieux ma thèse et pour leur chaleureux soutien. Je remercie également Christophe Carles, à la tête du Service de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire et « fondateur » du programme doctoral Irtelis qui a financé la majeure partie de mon doctorat, ainsi que Michel Riva et Pierre Legrain, précédents Chefs de l'Institut ayant exercés pendant ces quatre années. Merci à Joël Acker pour avoir choisi de m'encadrer tout au long de mon doctorat, malgré les hauts et les bas, et pour avoir tenu jusqu'au bout avec moi.

J'aimerai ensuite remercier tous les membres du jury pour leur grande patience et leur soutien pendant ma période de rédaction. Merci à Martin Teichmann et Frédéric Devaux d'avoir assumé la tâche des rapporteurs, et à Antonin Morillon et Daniel Gautheret pour leur disponibilité. J'adresse toute ma gratitude à Pascale Lesage, qui a assuré la difficile fonction de tutrice de thèse : Pascale, merci pour tous tes conseils, ton implication, ton soutien et ta présence.

Une pensée pour les équipes du Laboratoire Régulation de l'Expression des Gènes et Epigénétique, anciens et actuels membres, français ou étrangers, pour leur compagnie, leur soutien et leur bonne humeur. J'en profiterai pour remercier particulièrement Michel Riva et Olivier Lefebvre pour m'avoir bienveillamment accueillie en tant que colocataire de bureau pendant mes derniers mois au laboratoire. Merci à tous mes collègues des bâtiments 144 et 142. Mention spéciale pour ceux qui ont partagé les hauts et les bas de la vie de labo (et de la vie tout court aussi d'ailleurs) : Julie, Gégé, Cécile, Gwen, Nayla, Er, Emilie, Kathye, Aeid, Lucie, Kinsley, Maud, Nad'a, Kévin et j'en oublie sûrement ! Je pense aussi aux collègues du « LBSR », ces voisins de paillasse souvent et étrangement stationnés devant des ordinateurs au milieu du couloir. Bref, je souhaite remercier tous ceux qui m'ont apporté leur aide ou qui ont simplement contribué à la bonne ambiance qui régnait tout au long de ces années : thésards, post-docs, stagiaires, techniciens, chercheurs, si nombreux qu'il m'est impossible de les citer sans en oublier !

Que dire de la promo Irtelis... Merci camarades !!! Céline, Julien, Agnès, Yue, Julie, Adeline, Julia, Arhamatoulaye, Anastazja, Emilie, Arezki... et Sylvie Esterlin ! Merci également à mes autres camarades thésards du CEA : les biologistes et non biologistes de MAIOT. Avoir été enrolée (merci Clémence) et avoir géré l'assoc' avec Julien, Benoît, Agnès, Alex et Yohan resteront parmi mes meilleurs souvenirs de thèse.

Enfin, à mes amis, je ne pourrai jamais leur exprimer toute ma gratitude. Flo, DeJi, Elise, Haivu, Yang, votre présence m'ont été indispensables pendant ces années. Bien sûr, j'adresse mes plus profonds remerciements à ma famille, soutien inébranlable. Mes parents, Manola, Valérian, Olivier, Roberta, mais aussi Laurent, et ma seconde famille, Daniel, Françoise, Jérémie et Ludivine.

Merci d'avoir contribué à l'aboutissement de cette thèse. Une énième fois, **merci :-)**



---

# Table des matières

---

Remerciements .....	3
Abréviations .....	9
Chapitre 1 : Introduction .....	11
1.1 Introduction générale.....	11
1.1.1 Le flux de l'information génétique.....	11
1.1.2 Quelques mots sur notre modèle d'étude, la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	12
1.2 La transcription par l'ARN Pol III chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	12
1.2.1 Les transcrits par l'ARN Pol III .....	13
1.2.2 Les composants de la machinerie de transcription par l'ARN Pol III .....	14
1.2.3 Les différentes étapes de la transcription par l'ARN Pol III chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	21
1.3 La régulation de la transcription par l'ARN Pol III .....	26
1.3.1 Modulateurs de la transcription par l'ARN Pol III .....	26
1.3.2 La transcription par l'ARN Pol III est régulée <i>in vivo</i> en fonction d'autres mécanismes cellulaires .....	32
1.4 La répression de la transcription par l'ARN Pol III converge vers Maf1 .....	56
1.4.1 Maf1 intègre les signaux de diverses voies de signalisation .....	56
1.4.2 Maf1 est régulé par des phosphorylations et des déphosphorylations .....	58
1.4.3 Interactions de Maf1 avec la machinerie de transcription par l'ARN Pol III.....	60
1.5 Problématique .....	62
Chapitre 2 : Etude d'un régulateur de la transcription par l'ARN Pol III : la protéine Sub1 .....	63
2.1 La transcription par l'ARN Pol III <i>in vivo</i> est plus complexe que celle reconstituée <i>in vitro</i> .....	63
2.2 La protéine Sub1 et son orthologue PC4.....	64
2.2.1 Les fonctions de Sub1/PC4 .....	64
2.3 Sub1 est un régulateur de la transcription par l'ARN pol III.....	69
2.4 Résultats et discussions.....	84
2.4.1 Localisation de Sub1 sur le génome .....	84
2.4.2 Sub1 stimule deux étapes de la transcription : l'initiation et la réinitiation facilitée.....	84
2.4.3 Sub1 est requis pour une transcription par l'ARN Pol III optimale.....	86
2.4.4 Sub1 est-il impliqué dans la transcription par l'ARN Pol I ?.....	86

Chapitre 3 : Interactions de Sub1 et régulation de la transcription par l'ARN Pol III.....	89
3.1 Introduction.....	89
3.2 Etude des fonctions respectives de Sub1 et Maf1 dans la transcription par l'ARN Pol III .....	90
3.2.1 Croissance des souches <i>sub1Δ</i> , <i>maf1Δ</i> et <i>sub1Δ maf1Δ</i> .....	90
3.2.2 Comparaison des niveaux de transcrits Pol III dans les souches délétées pour <i>SUB1</i> et/ou <i>MAF1</i> , en 4NQO ou en rapamycine .....	92
3.2.3 Immunodétection des protéines Sub1 et Maf1 dans des cellules traitées au 4NQO ou à la rapamycine.....	97
3.2.4 Localisation cellulaire des protéines Sub1 et Maf1 .....	98
3.2.5 Conclusion de l'étude de la fonction de Sub1 par rapport à Maf1.....	106
3.3 Construction de double délétants et tests de croissance .....	108
3.3.1 Souches construites .....	109
3.3.2 Tests de croissance .....	109
3.4 Perspectives à l'étude des double délétants obtenus.....	112
 Chapitre 4 : Discussion et perspectives.....	 113
4.1 La protéine Sub1, un facteur de transcription complexe .....	114
4.1.1 Sub1 et la transcription par l'ARN Pol III.....	114
4.1.2 Sub1 pourrait-il être impliqué la transcription par l'ARN Pol I ? .....	114
4.1.3 Quels sont les domaines fonctionnels de Sub1 ? .....	115
4.2 D'autres conditions de croissance où Sub1 pourrait être essentiel ?.....	116
4.3 Considérations sur l'analyse de la transcription par l'ARN Pol III .....	116
4.3.1 Les gènes de classe III sont-ils tous transcrits de manière équivalente ?.....	116
4.3.2 Synthèse, maturation, export, dégradation .....	117
4.4 D'autres régulateurs de la transcription par l'ARN Pol III ?.....	119
4.4.1 La répression de la transcription par l'ARN Pol III en réponse au 4NQO.....	119
4.4.2 Quels autres mécanismes de régulation de la transcription par l'ARN Pol III peuvent exister ?.....	119
 Chapitre 5: Procédures expérimentales.....	 121
5.1 Méthodes de biologie cellulaire .....	121
5.1.1 Souches de levures <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et conditions de culture.....	121
5.1.2 Transformation de levure.....	122
5.1.3 Tests de croissance sur milieu solide .....	122
5.1.4 Méthodes d'imagerie .....	123
5.1.5 Acquisition d'images .....	124
5.2 Méthodes de biologie moléculaire.....	124
5.2.1 Délétion de <i>SUB1</i> dans les souches de la banque EUROFAN II .....	124
5.2.2 Extraction d'ADNg .....	125
5.2.3 Extraction protéique à l'acide trichloroacétique (TCA).....	125
5.2.4 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et immunodétection de protéines	

( <i>western-blot</i> ).....	125
5.2.5 Extraction des ARN.....	126
5.2.6 Détection d'ARN ( <i>northern-blot</i> ).....	126
Annexes .....	129
Bibliographie.....	135



---

# Abréviations

---

Abréviations couramment utilisées dans le présent rapport :

4NQO	<b>4-nitroquinoline-1-oxide</b>
ADN	<b>acide désoxyribonucléique</b>
AMPC	<b>adénosine monophosphate cyclique</b>
ARN	<b>acide ribonucléique</b>
ARNm	<b>messenger</b>
ARN Pol	<b>polymérase</b>
ARNr	<b>ribosomique</b>
ARNt	<b>de transfert</b>
ARNsn	<i>small nuclear</i> (petit ARN nucléaire)
ARNsno	<i>small nucleolar</i> (petit ARN nucléolaire)
DAPI	<b>4',6-diamidino-2-phénylindole</b>
DO	<b>densité optique</b> (absorbance)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (protéine fluorescente verte)
HA	<b>hemagglutinine</b>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC4	<i>positive cofactor 4</i>
RMN	<b>résonance magnétique nucléaire</b>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (dodécylsulfate de sodium)
<i>SUB1</i>	<i>suppressor of TFIIIB mutations 1</i>
TFIII	<i>transcription factor of RNA polymerase III</i> (facteur de transcription de l'ARN polymérase III)
Tris	<b>tris</b> (hydroxyméthyl)aminométhane
UV	<b>ultra-violets</b>
WT	<i>wild-type</i> (sauvage)
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>



---

# Chapitre 1

## Introduction

---

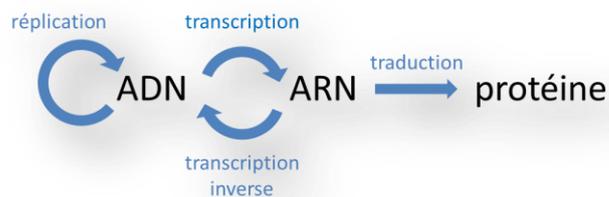
### 1.1 Introduction générale

#### 1.1.1 Le flux de l'information génétique

La cellule est l'unité fondamentale du vivant. En son sein se déroule un ensemble de réactions chimiques régulées appelé métabolisme qui lui permet de croître et de se reproduire. La cellule est composée de macromolécules très diverses en composition, en taille et en fonction. Soit elles sont nécessaires à la structure de la cellule, soit elles représentent un apport énergétique, soit elles confèrent une fonction spécifique à la cellule. La plupart de ces éléments constitutifs et fonctionnels sont synthétisés grâce à l'expression de l'information génétique.

Les réactions qui gouvernent cette expression de l'information génétique font partie du métabolisme de la cellule. Ces réactions sont, dans un premier temps, la transcription de l'acide désoxyribonucléique (ADN) en acide ribonucléique (ARN) et, dans un second temps, la traduction des ARN dits messagers (ARNm) en protéines. A ces réactions s'ajoute la réplication (ou duplication) de l'ADN, synthèse d'ADN à partir d'ADN, et la transcription inverse (ou reverse), synthèse d'ADN à partir d'ARN (figure 1). Chez les virus, on pourra ajouter la réplication de l'ARN, le génome viral pouvant être de type ARN.

Dans ce mémoire, c'est au mécanisme de transcription que nous nous intéressons.



**Figure 1.** Les différents types de transfert de l'information génétique dans une cellule

## 1.1.2 Quelques mots sur notre modèle d'étude, la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Quelques mots sur l'organisme modèle utilisé au cours de ce travail : *Saccharomyces cerevisiae*, appelée « levure de boulanger » ou aussi « levure de bière ».

La levure *S. cerevisiae* est reconnue comme un organisme modèle d'études, représentant un eucaryote simple dont le génome est facilement manipulable. La levure partage avec la bactérie de nombreux avantages techniques qui ont permis une avancée rapide de leur étude génétique et moléculaire : une croissance rapide, des cellules dispersées, une facilité de réplication et d'isolation sur milieu solide, un système génétique bien défini et, surtout, un système de transformation de l'ADN très flexible. D'autant plus que ce microorganisme n'est pas pathogène.

En 1996, *Saccharomyces cerevisiae* a été le premier eucaryote dont on a obtenu la séquence complète du génome (Goffeau et al., 1996). Elle devient alors un organisme modèle-clé dans les études génomiques. Ce champignon (fungus), de la famille des ascomycètes, appartient comme les animaux au phylum des opisthokontes. Son génome de 12 Mb contient au moins environ 6 000 gènes dont la plupart trouvent leurs orthologues chez l'homme (3 200 Mb, environ 30 000 gènes). On comprend alors que l'étude du génome de *S. cerevisiae* soit d'un aussi grand intérêt pour l'homme.

Les souches de *S. cerevisiae*, contrairement à d'autres microorganismes, sont stables non seulement sous leur forme diploïde mais aussi haploïde. Elles ont également l'avantage d'être viables avec un grand nombre de marqueurs génétiques, ce qui rend possible différents tests de caractérisation de mutations et de complémentation. Le développement de la transformation de l'ADN a rendu la levure particulièrement abordable au clonage de ses gènes et aux techniques d'ingénierie génétique. De l'ADN peut y être introduit *via* des plasmides autonomes ou intégré dans le génome par recombinaison homologue. La levure a largement été utilisée en génétique classique et en génétique inverse, contribuant à l'étude de gènes jusque -là encore inaccessible.

Les techniques de biologie moléculaire ont largement été exploitées chez *S. cerevisiae* dans l'étude de la régulation de gènes, la relation structure-fonction des protéines, la structure des chromosomes et autres grandes questions de la biologie cellulaire.

## 1.2 La transcription par l'ARN Pol III chez *Saccharomyces cerevisiae*

La transcription est catalysée par les ARN polymérases (ARN Pol). Depuis le début des années 1970, des biochimistes ont caractérisé différentes ARN Pol (pour articles récents, voir Archambault et Friesen, 1993 ; Cramer et al., 2002). Alors que les procaryotes ne possèdent qu'une seule et unique ARN Pol, les eucaryotes utilisent trois ARN Pol distinctes pour transcrire leur génome, auxquelles il est nécessaire d'ajouter les ARN Pol spécifiquement dédiées à la transcription des génomes mitochondriaux ou chloroplastiques. L'ARN polymérase I (ARN Pol I), est responsable de la

transcription du gène spécifiant le précurseur 35S des ARN ribosomiques (ARNr) (Paule et White, 2000). L'ARN polymérase II (ARN Pol II), transcrit l'ensemble des précurseurs des ARN messagers (ARNm) ainsi que des petits ARN stables et non traduits impliqués dans l'épissage, la modification des ARNr ou la régulation post-transcriptionnelle comme les ARNsn (pour *small nuclear*) et un certain nombre d'ARNsno (pour *small nucleolar*). Enfin, l'ARN polymérase III (ARN Pol III), synthétise des ARN nécessaires à la traduction comme les ARN de transfert (ARNt) ou l'ARNr 5S ainsi que d'autres petits ARN stables et non-traduits.

La biosynthèse des facteurs nucléiques et protéines composant la machinerie de traduction est l'une des fonctions cellulaires la plus consommatrice en énergie de la cellule : plus de 80 % de l'activité totale des trois systèmes transcriptionnels y est consacrée, dont 15% sont assurés par l'ARN Pol III (Warner, 1999). C'est à cette transcription par l'ARN Pol III que nous nous intéressons.

Dans cette partie, nous verrons tout d'abord les gènes transcrits par l'ARN Pol III. Nous verrons ensuite quels sont les composants de la machinerie de la transcription par l'ARN Pol III puis comment se déroule cette transcription. Nous aborderons finalement dans une dernière partie l'aspect régulationnel de la transcription par l'ARN Pol III et la problématique qui concerne le travail présenté dans les chapitres suivants.

### 1.2.1 Les transcrits par l'ARN Pol III

Les gènes transcrits par l'ARN Pol III sont appelés « gènes de classe III ». L'ARN Pol III transcrit des petits ARN non traduits, d'une taille généralement inférieure à 400 pb. Ces nombreux ARN interviennent dans des voies métaboliques fondamentales à la cellule, notamment la traduction des ARNm et la maturation des ARN. L'ARN Pol III transcrit également une variété de petits ARN de fonction encore inconnue (pour revues White, 2008 ; Dieci et al., 2007).

Parmi les transcrits synthétisés par l'ARN Pol III, on trouve en tout premier lieu les ARN de transfert (ARNt). Les ARNt sont les adaptateurs qui, au cours de la traduction, font correspondre un codon, séquence de trois bases, de l'ARNm à l'un des 20 acides aminés qui doit être incorporé à la chaîne polypeptidique naissante : les ARNt portent un anticodon, séquence de trois bases qui s'apparie au codon, et un acide aminé spécifique à l'anticodon. Les cellules eucaryotes utilisent 40 à 50 ARNt différents. En effet, la dégénérescence du code génétique explique l'existence de plus de 20 ARNt (à un acide aminé peut correspondre plus d'un codon), mais leur nombre n'atteint pas les 64 possibilités d'ARNt (4 bases possibles à chaque base du codon, soit  $4^3$ ) à cause du *wobble*, un mode d'appariement bancal qui permet à l'anticodon d'un ARNt de reconnaître plusieurs codons synonymes (correspondant au même acide aminé). De plus, étant donné la redondance des gènes spécifiant chaque ARNt, le nombre de gènes d'ARNt est considérablement plus important. Ainsi, la levure *Saccharomyces cerevisiae* possède 275 gènes d'ARNt (Goffeau et al., 1996 ; Percudani et al., 1997). Ils sont dispersés sur tout le génome, mais semblent transcrits en foyers à proximité du nucléole (THOMPSON *et al.* 2003).

Un autre petit ARN transcrit par l'ARN Pol III et participant à la traduction est l'ARNr 5S. L'ARNr 5S, spécifié par le gène *RDN5*, est composant de la grande sous-unité ribosomique. Chez S.

*cerevisiae*, *RDN5* est présent en 100 à 200 copies localisées au sein des répétitions d'ADNr du 35S elles-mêmes transcrites au nucléole par l'ARN Pol I. (Nath and Bollon, 1977; Elion and Warner, 1984).

Il existe d'autres transcrits synthétisés par l'ARN Pol III qui sont également incorporés dans des complexes ribonucléoprotéiques. Parmi eux, on trouve :

- l'ARN 7SL (gène *SCR1*), composant de la particule de reconnaissance du signal (SRP) qui est impliquée dans l'adressage des protéines au réticulum endoplasmique. Avec ses 522 nucléotides (contre en moyenne 80 nucléotides pour un gène d'ARNt), *SCR1* est le plus long gène de classe III (Felici et al., 1989).
- l'ARNsn U6 (gène *SNR6*) intégré au spliceosome, le complexe assurant l'épissage des ARNm (Kunkel et al., 1986).
- l'ARN H1 (gène *RPR1*) intégré à la RNase P, une enzyme impliquée dans la maturation de l'extrémité 5' des ARNt (Lee et al., 1991).

De manière remarquable, ces ARN sont essentiels à la viabilité cellulaire et participent à l'activité catalytique des complexes ribonucléoprotéiques dans lesquels ils sont retrouvés (Guerrier-Takada et al., 1983 ; Nissen et al., 2000).

Chez l'homme, d'autres ARN supplémentaires sont transcrits par l'ARN Pol III comme c'est le cas de l'ARN 7SK, impliqué dans la régulation de la transcription par l'ARN Pol II (pour revue, Diribarne et al., 2009), ou de la composante ARN de la RNase MRP. C'est le cas également des éléments SINE (*Short Interspersed Nuclear Element*) et des ARN *vaults*, dont la fonction exacte reste méconnue. Enfin, certains ARN viraux sont également transcrits par l'ARN Pol III : les ARN VAI et VAII de l'adénovirus et EBER1 et EBER2 du virus d'Epstein-Barr sont transcrits par l'ARN Pol III de la cellule hôte au cours de l'infection virale.

L'analyse relativement récente de l'occupation de la machinerie de transcription par l'ARN Pol III sur le génome de plusieurs organismes différents a conduit à l'identification de nouveaux ARN transcrits par l'ARN Pol III (Harismendy et al., 2003 ; Isogai et al., 2007 ; Roberts et al., 2003 ; Moqtaderi et al., 2004 ; Pagano et al., 2007 ; Dieici et al., 2007). L'évolution des technologies a même permis de séquencer directement l'ADN sur lequel les éléments de la machinerie de transcription pouvaient se lier (Canella et al., 2010 ; Barski et al., 2010 ; Moqtaderi et al., 2010 ; Raha et al., 2010 ; Oler et al., 2010). Les potentiels nouveaux gènes transcrits par l'ARN Pol III sont actuellement à l'étude.

## 1.2.2 Les composants de la machinerie de transcription par l'ARN Pol III

La transcription par l'ARN Pol III nécessite, en plus de la Pol elle-même, des facteurs d'initiation de la transcription : TFIIIA, TFIIIB et TFIIIC. Ces facteurs sont indispensables pour transcrire spécifiquement les gènes concernés. Ils sont nécessaires à l'étape de pré-initiation pour pouvoir initier correctement la transcription.

Ces facteurs de transcription ont été identifiés lors de fractionnements protéiques réalisés à partir d'extraits de cellules humaines (Segall et al., 1980) et d'autres organismes dont la levure (Klekamp et Weil, 1982). La transcription reconstituée *in vitro* nécessitait, en plus de l'ARN Pol III, les

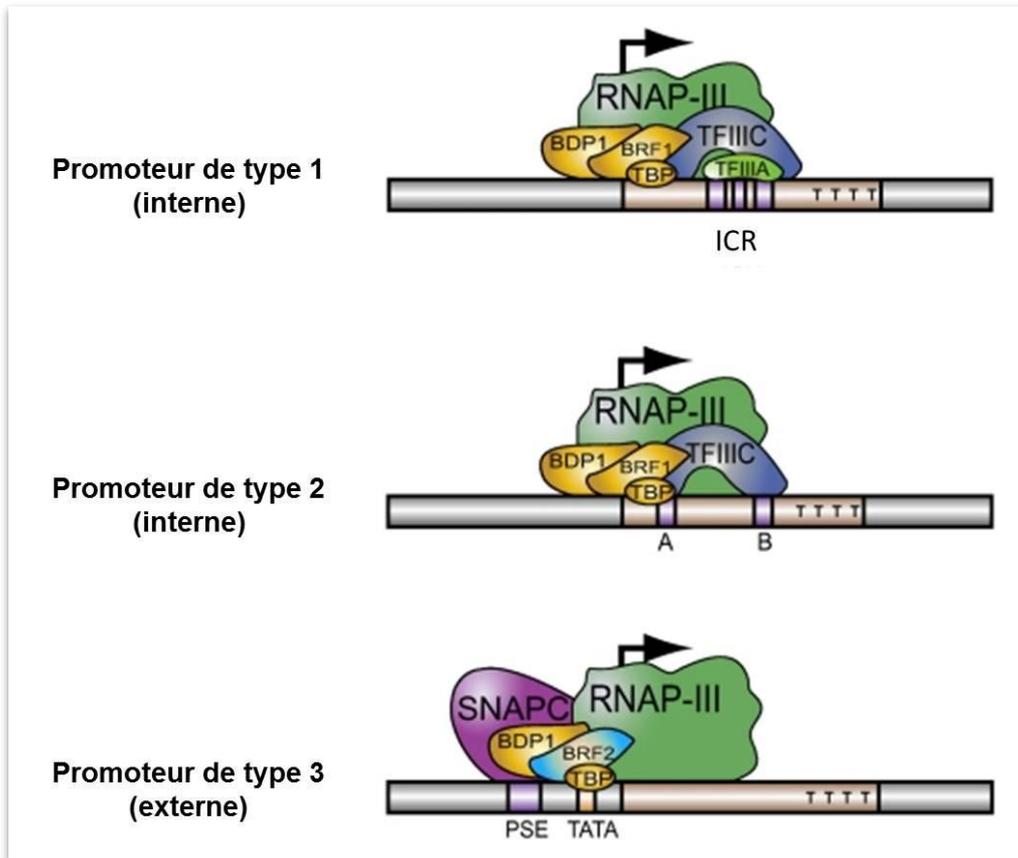
trois fractions protéiques contenant les activités de TFIIIA, TFIIIB et TFIIIC. Ces facteurs sont nécessaires et suffisants pour initier correctement la transcription par l'ARN Pol III mais il n'est pas exclu que les fractions protéiques contiennent d'autres constituants non essentiels impliqués dans la transcription (Andrau et Werner, 2001 ; Kassavetis et Steiner, 2006).

Afin de mieux comprendre la fonction de chacun des facteurs de transcription, il sera nécessaire d'aborder au préalable la classification des promoteurs des gènes de classe III : en effet leur structure détermine les composants indispensables de la machinerie de la transcription par l'ARN Pol III. Nous verrons ensuite la description de l'ARN Pol III et de chacun des facteurs de transcription TFIIIA, TFIIIB et TFIIIC.

### 1.2.2.1 La structure du promoteur du gène transcrit détermine les facteurs de transcription recrutés

L'ensemble des facteurs de transcription recrutés sur les gènes transcrits par l'ARN Pol III varie en fonction du promoteur du gène considéré. Les promoteurs des transcrits par l'ARN Pol III ont une structure discontinue et peuvent être regroupés dans trois catégories distinctes (figure 2 ; pour revue, Scramm et Hernandez, 2002 ; Huang et Maraia, 2001).

- Le promoteur de type 1, promoteur du gène de l'ARNr 5S, se situe dans la région codante du gène. Il se compose d'une boîte A suivie d'un élément intermédiaire puis d'une boîte C. La distance séparant les boîtes A et C est déterminante (environ 20 pb) pour l'efficacité de la transcription. Sur ce type de promoteur, le facteur TFIIIA se fixe d'abord sur la boîte C. Ensuite, TFIIIA recrute le facteur TFIIIC lequel recrute à son tour TFIIIB. Enfin, l'ARN Pol III complète ce complexe de préinitiation sur le promoteur du gène et amorce l'initiation de la transcription.
- Le promoteur de type 2 concerne notamment les gènes codant pour les ARNt, l'ARN 7SL et des gènes viraux. Il est également situé dans la région transcrite du gène et est caractérisé par la présence de deux boîtes A et B. L'efficacité de la transcription dépend fortement de la nature de ces séquences. Pour ce type de promoteur, le facteur TFIIIC se lie directement aux boîtes promotrices internes. Ensuite, TFIIIB puis l'ARN Pol III sont recrutés sur le gène.
- Chez l'homme, le promoteur de type 3, concernant le gène de l'ARNsn U6, se compose d'un élément distal (*Distal Sequence Element*, DSE) localisé très en amont du site d'initiation de la transcription, d'un élément proximal (*Proximal Sequence Element*, PSE) et d'une boîte TATA situés juste en amont de la région transcrite. Chez *S. cerevisiae*, le promoteur du gène de l'ARNsn U6 est mixte : il consiste en éléments internes et externes à la région codante du gène (boîte A notamment, de manière comparable aux promoteurs de type 2, et boîte TATA). Sur la séquence PSE est recruté le complexe SNAPc (*snRNA activating protein complex*, également appelé *PSE transcription factor* (PTF) ou *PSE-binding protein* (PBP)), tandis que parallèlement est recruté le facteur d'activation Oct-1 sur la séquence DSE. Ensuite une sous-unité du facteur TFIIIB, TBP (*TATA box binding protein*), est recrutée sur la boîte TATA. Une fois le facteur TFIIIB en place, l'ARN Pol III est recrutée.



**Figure 2. Les facteurs de transcription recrutés sur les différents types de promoteurs des gènes de classe III**

Les trois éléments du promoteur interne de type 1 sont regroupés dans l'Internal Control Region (ICR). Dans le promoteur de type 2, on retrouve les boîtes internes A et B. Le promoteur de type 3 contient un élément proximal (Proximal Sequence Element, PSE) et une boîte TATA. Les flèches marquent les sites d'initiation de transcription tandis que les signaux de terminaison sont indiqués par une suite de T (thymidines).

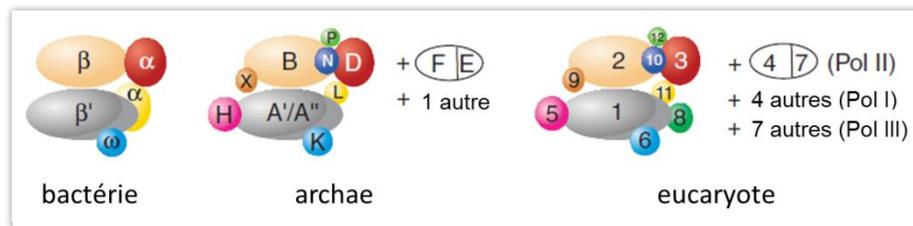
Parmi les facteurs de transcription requis, on trouve : les éléments du facteur TFIIB en jaune, le facteur TFIIC en bleu, TFIIA en vert clair, et l'ARN Pol III (RNAP) en vert foncé. Sur le promoteur de type 3, on trouvera en plus le complexe SNAPc pour l'initiation du gène. (D'après Canella et al., 2010)

### 1.2.2.2 L'ARN Pol III

Les ARN Pol sont des complexes multiprotéiques qui assurent la transcription.

Historiquement, les trois ARN Pol eucaryotes I, II et III étaient respectivement appelées A, B et C. Chacune de ces trois ARN Pol eucaryotes est plus complexe que l'ARN Pol bactérienne de structure  $\alpha\beta\beta'\omega$ , mais leurs structures globales sont toutefois similaires. Chaque ARN Pol eucaryote est un complexe multiprotéique composé de deux grandes sous-unités, homologues aux sous-unités bactériennes  $\beta$  et  $\beta'$ , qui sont toujours associées à des sous-unités plus petites (figure 3).

Ainsi, sur les 17 sous-unités de l'ARN Pol III (693 kDa), cinq sont communes aux trois ARN Pol (ABC27, ABC23, ABC14,5, ABC10 $\alpha$  et ABC10 $\beta$ ), deux autres sont partagées seulement avec l'ARN Pol I (AC19 et AC40), cinq sont homologues à des sous-unités de l'ARN Pol I et/ou II (C160, C128, C25, C17 et C11) et les cinq dernières sont vraisemblablement spécifiques à l'ARN Pol III (C82, C53, C37,



**Figure 3. Architecture des ARN Pol**

Représentation schématique des ARN Pol bactérienne, archae et eucaryotes. On retrouve chez toutes ces ARN Pol une structure de base similaire composée de deux grandes sous-unités (en gris et orange). Les autres sous-unités qui s'y associent sont indiquées pour chaque groupe. (D'après Cramer, 2002)

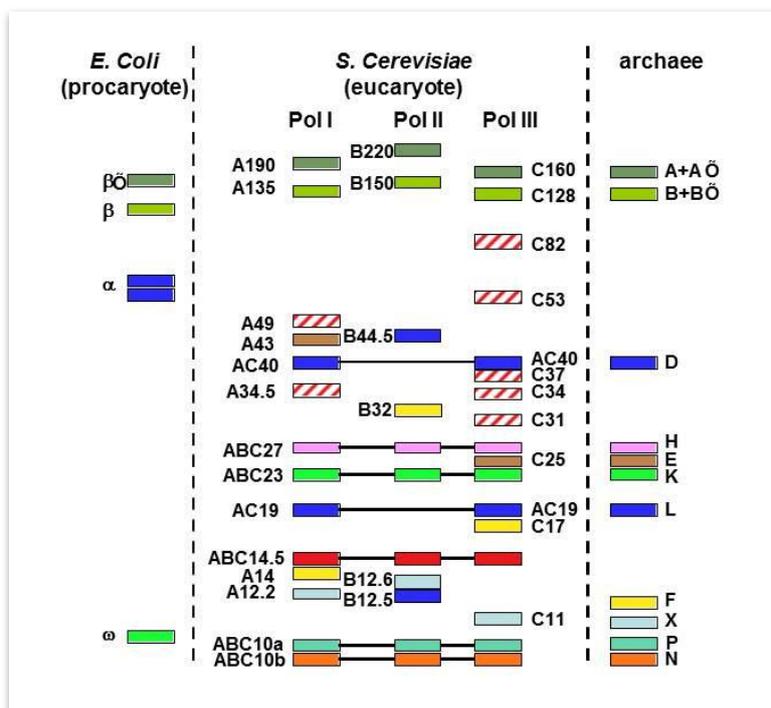
Chez *S. cerevisiae*, les sous-unités sont au nombre de 14 pour la Pol I, 12 pour la Pol II et 17 pour la Pol III. Certaines sous-unités sont spécifiques à leur Pol, d'autres sont communes à deux ou toutes les Pol : une sous-unité synthétisée à partir d'un gène pourra être intégrée à l'un ou l'autre des complexes multiprotéiques.

C34 et C31) (Huang et Maraia, 2001 ; Geiduschek et Kassavetis, 2001 ; Hu et al., 2002 ; Schramm et Hernandez, 2002 ; Carter et Drouin, 2010) (figure 4). On note toutefois que les sous-unités C53 et C37 présentent une faible homologie de séquence avec le facteur d'initiation de TFIIIF de la machinerie de transcription par l'ARN Pol II. De même, les sous-unités C82 et C34 pourraient être apparentées aux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du facteur d'initiation TFIIIE.

La structure cristallographique de l'ARN Pol III n'a pas encore été obtenue mais la prédiction de localisation des sous-unités de l'ARN Pol III (Flores et al., 1999) et l'obtention du cristal de l'ARN Pol II, qui partage des sous-unités homologues au complexe multiprotéique de l'ARN Pol III (Cramer et al., 2002 et 2006 ; Geiduschek et Kassavetis, 2001), ont permis de proposer un modèle de structuration de l'ARN Pol III dans lequel les 17 sous-unités ont été replacées. Ce modèle a été affiné grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse et de la cryo-microscopie électronique (Lorenzen et al., 2007 ; Fernández-Tornero et al., 2007) (figure 5).

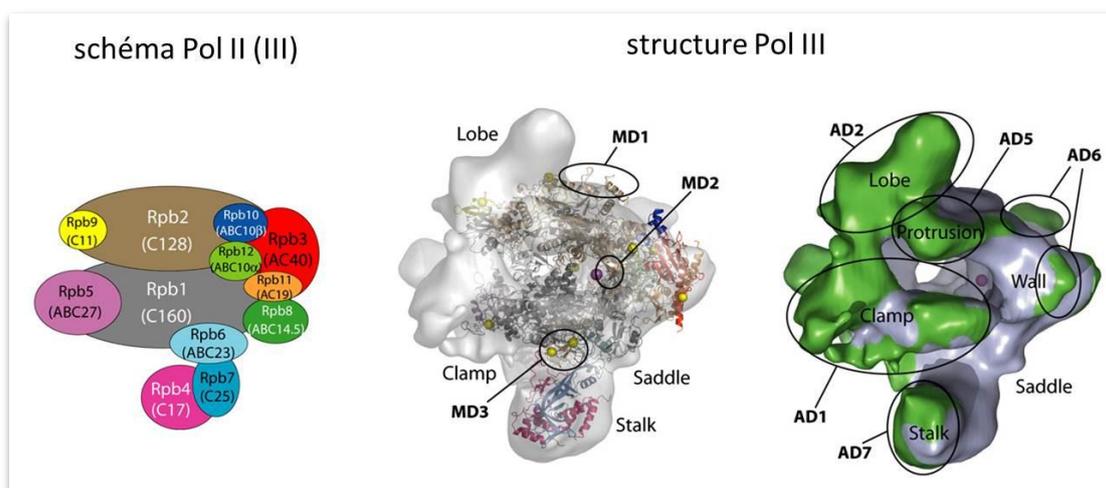
L'ARN Pol III posséderait un cœur de dix sous-unités similaire à celui retrouvé chez la Pol II (Armache et al., 2005 ; Cramer et al., 2001), duquel dépasse le sous-complexe C17/C25. Ce sous-complexe C17/C25 est impliqué dans l'initiation de la transcription *via* la reconnaissance des facteurs de transcription et fixerait par ailleurs le transcrit naissant (Dezélé et al., 1976 ; Jasiak et al., 2006). Les sous-unités C82, C34 et C31 forment un sous-complexe trimérique stable (Werner et al., 1992 ; Wang et Roeder, 1997), localisé au-dessus du sillon central du complexe entier où se loge l'ADN (Fernandez-Tornero et al., 2007). C53 et C37 forment un hétérodimère qui interagit avec le précédent sous-complexe pour ouvrir l'ADN au niveau du promoteur (Kassavetis et al., 2010). Ils ont également un rôle dans la reconnaissance des séquences de terminaison (Landrieux et al., 2006). De plus, cet hétérodimère, lorsqu'il est associé à C11, intervient également dans la réinitiation facilitée. Quant à la sous-unité C11, elle est impliquée dans l'activité de clivage de l'ARN intrinsèque à la Pol III (Chédin et al., 1998).

Chez l'homme, on trouve deux isoformes de l'ARN Pol III selon qu'elle contienne la sous-unité RPC32 $\alpha$  (ARN Pol III $\alpha$ ) ou RPC32 $\beta$  (ARN Pol III $\beta$ ). La forme  $\beta$  est considérée comme la forme générale de l'ARN Pol III, la forme  $\alpha$  étant exprimée dans des types cellulaires spécifiques et de manière intéressante dans les cellules indifférenciées (Haurie et al., 2010 ; Teichmann et al., 2010).



**Figure 4. Représentation schématique des sous-unités d'ARN Pol bactérienne, eucaryotes et archaebactérienne**

Les sous-unités sont représentées classées par taille, à l'image d'une séparation électrophorétique de protéines. Les sous-unités de même couleur sont paralogues chez *S. cerevisiae* et orthologues entre règnes du vivant. Les sous-unités communes aux trois ARN Pol de levure *S. cerevisiae* sont reliées entre elles par un trait noir. Les sous-unités spécifiques à la Pol I et spécifiques à la Pol III sont hachurées.



**Figure 5. Structure de l'ARN Pol III comparée à celle de l'ARN Pol II**

A gauche, une représentation schématique de la Pol II avec les correspondances des sous-unités de la Pol III entre parenthèses. Au milieu et à droite, la structure de la Pol III déterminée par cryo-microscopie. La superposition de la Pol III et de la Pol II (représentation en ruban au milieu) fait apparaître les domaines absents dans l'ARN Pol III (numérotées « MD ») et les domaines spécifiques à la Pol III (numérotées « AD » et représentées en vert). (d'après Fernandez-Tornero et al., 2007)

### 1.2.2.3 Les facteurs de transcription des gènes de classe III

Au cours d'une transcription *in vitro*, l'ARN Pol III purifiée est capable de terminer correctement la synthèse de l'ARN (Cozzarelli et al., 1983). Cependant, elle ne parvient pas à réaliser seule la transcription spécifique d'un gène : l'ARN Pol III ne possède pas de capacité intrinsèque de reconnaissance des promoteurs décrits précédemment. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'initiation précise de la transcription est en effet dépendante des facteurs de transcription TFIIC, TFIIIB et, dans le cas de la transcription de l'ARNr 5S, de TFIIIA. Dans cette partie, nous nous intéressons plus particulièrement aux facteurs de transcription TFIIIA, TFIIC et TFIIIB décrits chez la levure *S. cerevisiae*.

#### 1.2.2.3.1 Le facteur TFIIIA

Le facteur TFIIIA (50 kDa chez *S. cerevisiae*) est une protéine spécifique à la transcription du gène de l'ARNr 5S (*RDN5*). Son rôle est celui d'un adaptateur, intermédiaire entre le facteur TFIIC et le promoteur spécifique du gène *RDN5*.

TFIIIA a été le premier facteur de transcription purifié grâce à sa grande abondance dans les œufs de xénope (Engelke et al., 1980). Il est essentiel à la viabilité de la levure. TFIIIA est peu conservé au cours de l'évolution avec moins de 20 % d'identité de séquence avec celle de son homologue amphibien (Archambault et al., 1992).

TFIIIA se lie à la boîte promotrice C du gène de l'ARNr 5S et est de ce fait indispensable à sa transcription (Camier et al., 1995). Le facteur TFIIIA contient neuf doigts de zinc chez *S. cerevisiae* qui lui permettent de se lier à l'ADN (Gaskins et Hanas, 1990). Les doigts de zinc 1 et 7 de TFIIIA interviennent spécifiquement dans le recrutement de TFIIC (Rothfels et al., 2007).

#### 1.2.2.3.2 Le facteur TFIIC

Chez *S. cerevisiae*, le facteur TFIIC (600 kDa) est composé de six sous-unités. Ce complexe protéique est également essentiel à la viabilité de la levure. TFIIC reconnaît à la fois le complexe TFIIIA-*RDN5* (lorsque TFIIIA est lié au promoteur du gène *RDN5*) et les boîtes A et B des promoteurs de type 2.

Chez la levure, des études de protéolyses ménagées de ce facteur de transcription ont montré l'existence de deux domaines nommés  $\tau$ A et  $\tau$ B (Marzouki et al., 1986). Ces deux entités sont visibles sous forme de deux particules globulaires associées en microscopie électronique (Schultz et al., 1989). Le domaine  $\tau$ A est composé des sous-unités  $\tau$ 131,  $\tau$ 95 et  $\tau$ 55 tandis que le domaine  $\tau$ B est composé des sous-unités  $\tau$ 138,  $\tau$ 91 et  $\tau$ 60.

L'association spécifique et stable de TFIIC au promoteur intragénique de type 2 exige d'abord l'établissement d'une liaison forte entre  $\tau$ B et la boîte promotrice B, puis une liaison faible de  $\tau$ A à la boîte promotrice A (Marzouki et al., 1986 ; Deprez et al., 1999 ; Ducrot et al., 2006). L'association des domaines de TFIIC et le recrutement du facteur de transcription TFIIIB par TFIIC sur le gène implique particulièrement la sous-unité  $\tau$ 60 de  $\tau$ B (Mylona et al., 2006).

### 1.2.2.3.3 Le facteur TFIIIB

Le facteur TFIIIB (200 kDa) est le facteur nécessaire au recrutement de l'ARN Pol III quel que soit le type de promoteur du gène. Le facteur TFIIIB n'est pas une entité moléculaire stable : son activité peut être séparée par chromatographie en deux fractions nommées B' et B'' (Kassavetis et al., 1990 ; Huet et al. 1994). Deux des sous-unités de TFIIIB, Brf1 et TBP, sont présentes dans la fraction B' (Margottin et al., 1991; Kassavetis et al., 1992b; Lobo et al., 1992; Simmen et al., 1992) tandis que la troisième sous-unité, Bdp1, est présente dans la fraction B'' (Bartholomew et al., 1991; Kassavetis et al., 1991).

Parmi les trois sous-unités de TFIIIB, la protéine TBP (*TATA Binding Protein*, 27 kDa) a la particularité d'être un facteur commun aux transcriptions par les trois types d'ARN Pol I, II et III (Margottin et al., 1991 ; Steffan et al., 1996). TBP se lie à l'ADN, au niveau de la boîte TATA située en amont du site d'initiation des gènes. Elle contribue à la stabilité de la liaison du facteur entier TFIIIB sur les gènes de classe III (Huet and Sentenac, 1992). On notera l'existence chez les mammifères de trois paralogues de TBP : les *TBP-related factors* (TRF). Parmi eux, TRF1 et TRF3 sont vraisemblablement les seules formes impliquées dans la transcription par l'ARN Pol III (pour revue, Teichmann et al., 2010).

Une deuxième sous-unité de TFIIIB est la protéine Brf1 (pour *TFIIIB related factor 1*, 67 kDa). Cette sous-unité est importante dans la stabilité du complexe TFIIIB•ADN et dans le recrutement de l'ARN Pol III au promoteur. La région N-terminale de Brf1 interagit non seulement avec TBP (SCHRODER *et al.* 2003) mais aussi avec TFIIIC (CHAUSSIVERT *et al.* 1995 ; WANG and ROEDER 1995). D'ailleurs, cette partie N-terminale de Brf1 est homologue au facteur TFIIIB (facteur de la transcription par l'ARN Pol II) qui interagit de manière très comparable avec le facteur TFIIID qui contient TBP pour recruter l'ARN Pol II sur l'ADN (ORPHANIDES *et al.* 1996; revue de SCHRAMM and HERNANDEZ 2002). La partie C-terminale de la protéine Brf1 ne présente aucune similitude avec d'autres facteurs de transcription mais possède trois régions conservées dont notamment une impliquée dans des interactions avec les autres sous-unités TBP et Bdp1 (KASSAVETIS *et al.* 2006). Finalement, Brf1 participe aux dernières étapes de l'initiation, notamment lors de l'ouverture de la double hélice d'ADN et au démarrage de la fourche de transcription (KASSAVETIS *et al.* 2003). Chez les mammifères, deux formes du facteur TFIIIB coexistent suivant la présence de Brf1 (TFIIIB-β) ou de son isoforme Brf2 (TFIIIB-α) ; le facteur humain TFIIIB-β est requis pour les promoteurs de types 1 et 2 alors que le facteur TFIIIB-α est celui nécessaire au recrutement de l'ARN Pol III sur le gène humain de l'ARNsn U6 (promoteur de type 3) (Teichmann et Seifart., 1995 ; Teichmann et al., 1997 ; McCulloch et al., 2000).

La troisième sous-unité de TFIIIB est la protéine Bdp1 (pour *TFIIIB double prime 1*, 68 kDa). Bdp1 est nécessaire à l'assemblage de TFIIIB. Il interagit en effet *in vitro* avec le complexe TFIIIC•Brf1•TBP•ADN et le stabilise, rendant ainsi possible le recrutement de l'ARN Pol III (Rüth et al., 1996). L'analyse de la séquence polypeptidique de Bdp1 révèle un domaine caractéristique de liaison à l'ADN, le domaine SANT, qui interagit avec Brf1 (Aasland et al., 1996). Bdp1, conjointement avec Brf1, est particulièrement impliqué dans l'ouverture du promoteur et dans l'initiation de la transcription par l'ARN Pol III (Kassavetis et al., 2003). Bdp1 joue également un tout autre rôle, dans la maturation des ARNt, *via* une interaction avec la RNase P (Ishiguro et al., 2002).

### 1.2.3 Les différentes étapes de la transcription par l'ARN Pol III chez *Saccharomyces cerevisiae*

La caractérisation des facteurs de transcription est loin d'être précise. Néanmoins un modèle séquentiel a été proposé sur la base des interactions découvertes et des nombreuses expériences de transcription *in vitro*.

La transcription d'un gène peut être décomposée en quatre étapes distinctes (pour une revue, Paule et White, 2000) (figure 6). La première est le recrutement des facteurs généraux de transcription au niveau des promoteurs puis la reconnaissance par l'ARN Pol III de ce complexe ADN•facteur. La Pol III est alors présente au site d'initiation de la transcription, en interaction directe avec l'ADN et les facteurs. Cet ensemble forme le complexe de pré-initiation (PIC). Ensuite, à la deuxième étape qui est l'initiation, une bulle de transcription se forme, correspondant à la dénaturation locale de l'ADN et à l'ouverture du double-brin. Puis à la troisième étape, la Pol III entre en élongation processive et incorpore les nucléotides à l'ARN naissant. Enfin, à l'arrivée au terminateur, l'ARN transcrit est libéré, et l'ARN Pol III peut être recyclée de manière facilitée sur le même gène.

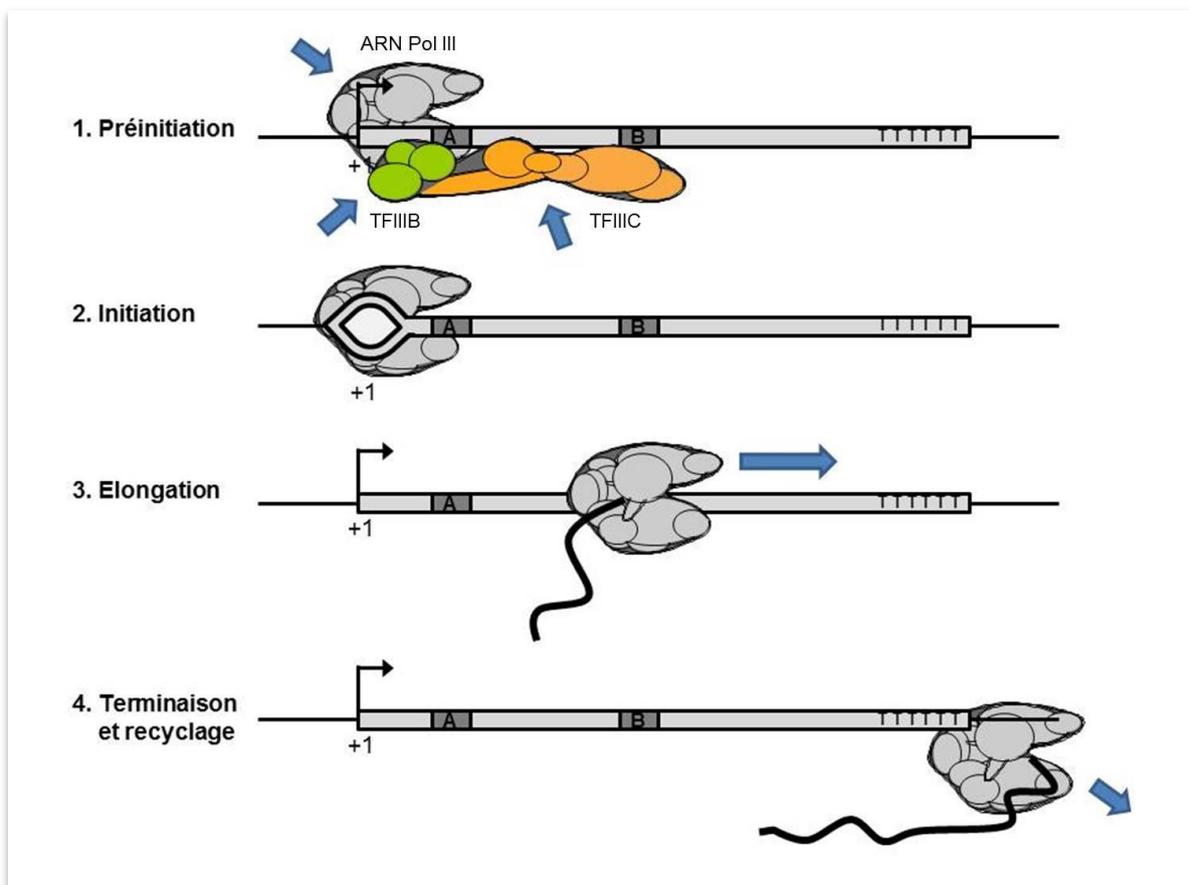


Figure 6. Les quatre étapes de la transcription par l'ARN Pol III

### 1.2.3.1 La formation du complexe de pré-initiation

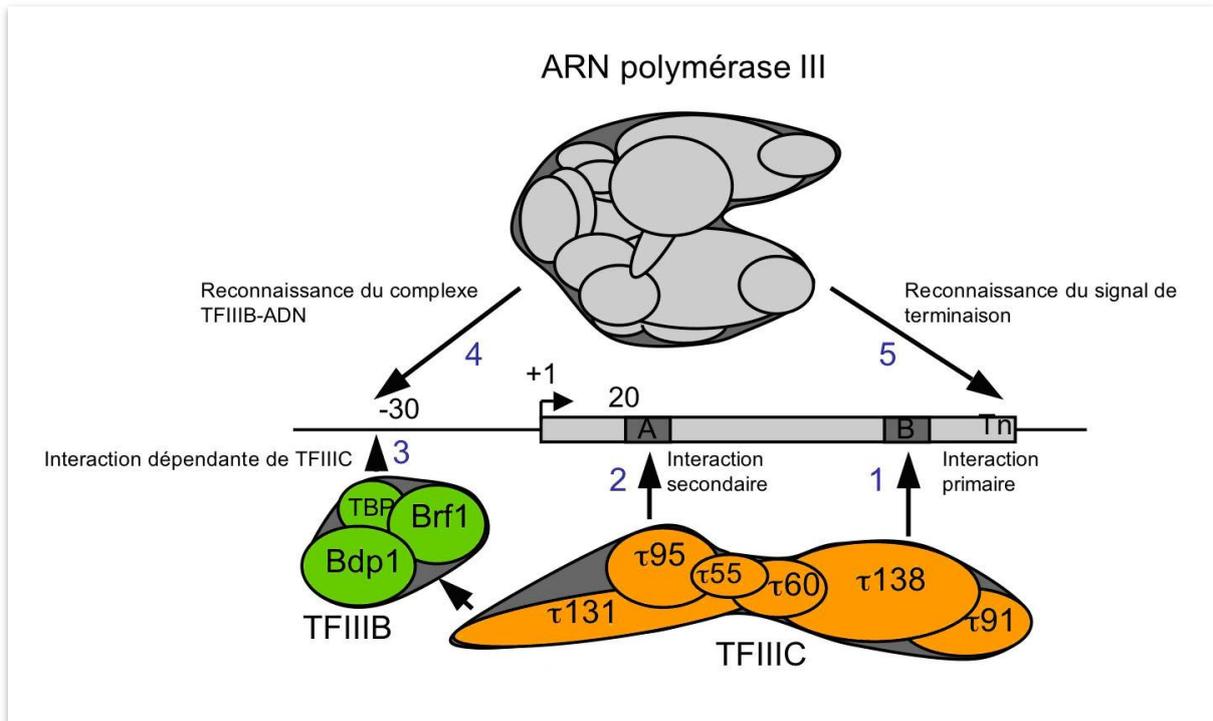
La formation du complexe de pré-initiation est la première étape, cruciale, de la transcription par l'ARN Pol III. C'est à cette étape que l'ARN Pol III est correctement positionnée sur le site d'initiation de la transcription. Cette étape conduit à l'assemblage de l'ensemble des facteurs essentiels à l'initiation de la transcription (figure 7).

Dans le cas du gène *RDN5* (spécifiant l'ARNr 5S), la formation du complexe de préinitiation débute par la liaison de TFIIIA sur les séquences promotrices. Les doigts de zinc de la région N-terminale de TFIIIA se lient à la boîte promotrice C au niveau du grand sillon de la double hélice d'ADN. Cette liaison constitue le principal point d'ancrage de TFIIIA au promoteur du gène. Une liaison de plus faible affinité s'établit ensuite entre d'autres doigts de zinc et la boîte promotrice A (Nolte et al., 1998). La liaison de TFIIIA aux séquences promotrices du gène de l'ARNr 5S est hautement spécifique mais relativement instable (Hanas et al., 1984). Elle est cependant stabilisée par l'association de TFIIIC (Keller et al., 1992).

Pour l'ensemble des autres gènes de classe III, le premier facteur recruté sur les séquences promotrices est TFIIIC chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les sous-unités  $\tau_{138}$  et  $\tau_{91}$  du sous-domaine  $\tau_B$  coopèrent pour la liaison de TFIIIC à l'ADN (Arrebola et al., 1998). Les protéines  $\tau_{95}$  et  $\tau_{55}$  du sous-domaine  $\tau_A$  se positionnent ensuite respectivement près de et à l'extrémité 3' de la boîte A. La sous-unité  $\tau_{55}$  est en contact direct avec  $\tau_{95}$  par son extrémité C-terminale (Manaud et al., 1998), tandis que  $\tau_{60}$  semble faire le pont entre les domaines  $\tau_A$  et  $\tau_B$  (Deprez et al., 1999). Ensuite,  $\tau_{60}$  et  $\tau_{131}$  conduisent le recrutement de TFIIIB en interagissant notamment avec les sous-unités Bdp1 et TBP de TFIIIB (Rüth et al., 1996; Dumay-Odelot et al., 2002; Mylona et al., 2006).  $\tau_{131}$  est une protéine très structurée, formée d'une succession d'hélices  $\alpha$ , dont les changements de conformation induits par mutation peuvent altérer le recrutement de Brf1 (Moir and Willis, 2004). Le réseau d'interactions entre les deux facteurs généraux de transcription TFIIIC et TFIIIB conduit ainsi au positionnement de TFIIIB sur les régions en amont du site d'initiation de la transcription.

Une fois le facteur TFIIIB recruté par TFIIIC, le complexe TFIIIB•ADN est stable. Cette stabilité ne dépend plus de la présence de TFIIIC sur l'ADN : *in vitro*, TFIIIC peut être dissocié de l'ADN par compétition avec de l'héparine, tandis que TFIIIB reste lié à l'ADN (Kassavetis et al., 1990).

La mise en place de la machinerie transcriptionnelle est terminée par le recrutement et le positionnement correct de l'ARN Pol III. Elle implique essentiellement TFIIIB. Le positionnement de la Pol III au site initiateur de la transcription est assuré par un certain nombre d'interactions protéiques entre les sous-unités de TFIIIB, de TFIIIC et celles de la Pol III. Les sous-unités C82, C34 et C31 de l'ARN Pol III sont requises dans la reconnaissance du complexe TFIIIB•ADN (Werner et al., 1992; Thuillier et al., 1995). Ensuite, du côté de TFIIIB, sa sous-unité Brf1 interagit avec les sous-unités C34 et C17 de l'ARN Pol III (Werner et al., 1993; Khoo et al., 1994; Andrau et al., 1999; Ferri et al., 2000). Du côté de TFIIIC, la sous-unité  $\tau_{131}$  interagit avec les sous-unités C53 et ABC10 $\alpha$  de l'ARN Pol III tandis que la sous-unité  $\tau_{138}$  est en relation avec ABC10 $\alpha$  (Lefebvre et al., 1994; Dumay et al., 1999; Flores et al., 1999).



**Figure 7. Modèle de la formation du complexe de pré-initiation de la transcription par l'ARN Pol III chez *Saccharomyces cerevisiae***

Le facteur TFIIC reconnaît les boîtes A et B via respectivement les domaines  $\tau A$  et  $\tau B$ . Il recrute ensuite le facteur TFIIB en amont du gène. Le complexe ADN•TFIIC•TFIIB est reconnu par l'ARN Pol III qui est ainsi recrutée et positionnée correctement pour initier la transcription. Les chiffres en bleu indiquent l'ordre présumé des événements.

### 1.2.3.2 L'initiation

Une fois le complexe de pré-initiation correctement assemblé et l'ARN Pol III positionnée, l'initiation de la transcription peut débuter.

L'ADN autour du site de démarrage de la transcription est dénaturé. L'ouverture de la double hélice d'ADN permet de former la bulle de transcription qui s'étend de part et d'autre du site d'initiation sur environ 22 pb (Kassavetis et al., 1990; Kassavetis et al., 1992a). L'ARN Pol est alors capable de synthétiser les premières liaisons phosphodiester. Bdp1 serait impliqué dans la formation initiale de la bulle tandis que Brf1 aiderait à sa propagation (Kassavetis et al., 2003). Lorsque la taille du transcrit naissant atteint une dizaine de nucléotides (6 au minimum), la Pol change de conformation. Elle rompt alors les interactions précédemment établies avec le complexe de préinitiation et quitte le promoteur. Au cours de cette dernière étape de l'initiation de la transcription, appelée le départ ou l'échappement du promoteur, deux ou trois transcrits abortifs sont produits avant que la synthèse du transcrit entier ne démarre (Bhargava and Kassavetis, 1999).

### 1.2.3.3 L'élongation

Au cours de l'élongation, la bulle de transcription progresse sur le gène et l'ARN Pol III synthétise au fur et à mesure l'ARN. La taille de la bulle diminue de 22 (à l'initiation) à 17 voire 13 pb (pendant l'élongation). Au sein de la bulle, le duplex formé par l'ADN et par la chaîne naissante d'ARN mesure environ 7 pb (Kassavetis et al., 1992a). A 20°C, la vitesse moyenne de synthèse de l'enzyme est de 20 nt/sec. La vitesse d'élongation est variable selon la région du gène, l'élongation n'étant pas un processus homogène. Certaines séquences du gène sont des sites de pause au niveau desquels l'ARN Pol III s'arrête, se rétracte en hydrolysant la dernière liaison phosphodiester formée, puis polymérise à nouveau, une ou plusieurs fois de suite. Le taux d'élongation de la chaîne est donc très variable en fonction de la composition de la séquence (Matsuzaki et al., 1994 ; Bobkova et Hall, 1997).

De manière intéressante, il semble que l'ARN Pol III soit capable de détacher TFIIC au fur et à mesure de son avancée sur le gène (Bardleben et al., 1994; Matsuzaki et al., 1994). Toutefois, des expériences de compétition entre différentes matrices ont montré que TFIIC reste généralement associé à l'ADN (Ruet et al., 1984). Le facteur TFIIC resterait alors lié à l'ADN en étant maintenu alternativement par  $\tau A$  puis  $\tau B$  au cours du passage de la Pol III. Une autre observation *in vivo* suggère l'exclusion de TFIIC sur l'ADN par l'ARN Pol III : l'occupation de TFIIC sur un gène de classe III augmente en absence d'activité transcriptionnelle (Roberts et al., 2003). Mais une autre hypothèse serait que TFIIC soit retenu par son interaction avec TFIIB. En effet, lorsque la transcription est initiée de manière TFIIB-indépendante en présence de TFIIC, ce dernier se dissocie de l'ADN et est libéré dans le milieu (Bardleben et al., 1994). En conclusion, l'analyse de l'occupation de TFIIB, de TFIIC et de l'ARN Pol III sur les gènes de classe III indique que TFIIB et la Pol III sont bien présents sur les gènes, mais que TFIIC ne semble pas y être spécifiquement représenté, ce qui soutient le caractère transitoire du complexe TFIIC•ADN *in vivo* (Soragni et al., 2008).

### 1.2.3.4 La terminaison et le recyclage

L'ARN Pol III est capable d'effectuer seule la terminaison de la transcription (pour revue Richard et Manley, 2009). L'ARN Pol III reconnaît le signal de terminaison de la transcription, composé d'une séquence de polythymines, sans l'aide d'aucun facteur annexe (Cozzarelli et al., 1983). Cependant, on note que la reconnaissance du signal de terminaison par l'ARN Pol III est influencée par la région l'entourant (Braglia et al., 2005). La reconnaissance du signal de terminaison et le clivage de l'ARN sont deux activités distinctes pouvant être découplées (Campbell et al., 1992). Au cours de l'étape de terminaison, la Pol assure également l'activité de clivage de l'ARN naissant. Ainsi, le signal de terminaison oblige l'ARN Pol III à pauser, ce qui aboutit à sa dissociation de la matrice ADN (Bobkova et Hall, 1997) puis la Pol clive le transcrit. La sous-unité C11 de l'ARN Pol III semble impliquée dans ce clivage (Whitehall et al., 1994 ; Chédin et al. 1998b ; Landrieux et al., 2006).

Un autre phénomène accompagne en particulier la terminaison de la transcription par l'ARN Pol III. Il s'agit de la réinitiation facilitée de la transcription. En effet, passé le premier cycle de

transcription, l'ARN Pol III n'est pas libérée de la matrice : elle réinitie préférentiellement sur le même gène des cycles de transcription 5 à 10 fois plus rapidement que le premier cycle (Dieci et Sentenac, 1996).

La sous-unité C11 est également impliquée dans cette étape de réinitiation, indépendamment de sa fonction dans le clivage de l'ARN naissant (Landrieux et al., 2006). Il a par ailleurs été observé que sur des petites unités transcrites, l'ARN Pol III reste toujours à proximité du promoteur, grâce notamment à la courbure de la molécule d'ADN (Ferrari et al., 2004). Cette propriété aiderait au recyclage efficace du complexe multiprotéique de l'ARN Pol III après la libération du transcrit synthétisé. Par ailleurs, les deux facteurs TFIIIB et TFIIIC sont impliqués dans cette réinitiation facilitée. A la fin d'un cycle de transcription, TFIIIB reste associé au promoteur et facilite la recapture de l'ARN Pol III aux séquences promotrices des petits gènes de classe III, permettant ainsi le démarrage rapide d'un autre cycle. La présence de TFIIIC stimule fortement le taux de réinitiation sur des gènes longs comme *SCR1*, probablement par compaction de l'unité de transcription *via* des courbures de l'ADN. Cependant, lorsque ces expériences sont réalisées en présence de TFIIIB recombinant et non plus à partir de la fraction B'', la réinitiation n'est plus détectée, suggérant l'existence d'un élément nécessaire à la réinitiation facilitée dans la fraction B'' (Ferrari et al., 2004 ; Ferrari et Dieci, 2008).

### 1.2.3.5 Holoenzyme ou assemblage séquentiel de la machinerie de transcription ?

La formation du complexe d'initiation de la transcription par l'ARN Pol III a tout d'abord été décrite comme un mécanisme séquentiel, grâce à des expériences *in vitro*. Le modèle d'assemblage séquentiel propose que les facteurs généraux de transcription se fixent sur le promoteur dans un ordre précis et assurent le recrutement ultérieur de l'ARN Pol.

Toutefois, à ce modèle séquentiel s'oppose le modèle de type holoenzyme dans lequel la machinerie de transcription est pré-assemblée et fonctionnelle. L'existence de sous-complexes pré-assemblés de la machinerie de transcription par l'ARN Pol III a été observée (Wang et al., 1997; Lane et al., 2011). Chez *S. cerevisiae*, un holoenzyme fonctionnel a pu être caractérisé mais dans une proportion très faible (moins de 1% des ARN Pol III) (Chédin et al., 1998b). Cet holoenzyme pourrait par conséquent provenir d'un complexe de pré-initiation assemblé séquentiellement qui aurait été co-purifié dans des conditions ménagées. Une autre hypothèse expliquant la présence de sous-complexes pré-assemblés est que les sous-unités se séquestrent en s'associant. Cette séquestration empêcherait ainsi des interactions avec d'autres protéines compétitrices et favoriserait par ailleurs l'interaction des sous-unités de la machinerie de transcription entre elles (Geiduscheck et Kassavetis, 2001).

## 1.3 La régulation de la transcription par l'ARN Pol III

Au cœur de la cellule, de nombreux mécanismes se coordonnent et sont finement régulés en réponse à des changements environnementaux qui peuvent constituer un stress ponctuel ou permanent pour la cellule. L'adaptation de son métabolisme constitue un enjeu majeur pour la survie de la cellule. Cette adaptation en fonction des conditions environnementales nécessite entre autres la régulation de la transcription par l'ARN Pol III, essentielle à la synthèse des protéines et à la croissance.

Dans cette dernière partie de l'introduction, nous décrivons quelques modulateurs ainsi que les régulations connues auxquelles la transcription par l'ARN Pol III est soumise.

### 1.3.1 Modulateurs de la transcription par l'ARN Pol III

Contrairement au système de transcription par l'ARN Pol II, seul un petit nombre d'éléments modulateurs a été identifié au cours d'études sur la transcription par l'ARN Pol III. Certains d'entre eux ont été identifiés chez les animaux et ne semblent pas conservés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Parmi les facteurs stimulant la transcription par l'ARN Pol III, on répertorie TFIIA, TFIIIS, Nhp6, Staf, la protéine La, les facteurs NF1, la topoisomérase I, PC4, l'activité TFIIIE et la RNase P. Du côté de la répression, on recense la protéine Dr1. Tous ces facteurs, récapitulés en tableau 1, ont été plus ou moins bien caractérisés et peuvent réguler la transcription à plusieurs étapes, de l'initiation à la réinitiation.

#### 1.3.1.1 TFIIA et TFIIIS

Deux facteurs de la machinerie de transcription par l'ARN Pol II, TFIIA et TFIIIS, respectivement impliqués dans l'initiation et l'élongation de la transcription par l'ARN Pol II (pour revue récente, Nechaev et Adelman, 2010), sont capables de stimuler la transcription par l'ARN Pol III. La fonction réelle de ces facteurs dans la transcription par l'ARN Pol III reste largement inconnue.

L'addition de **TFIIA** recombinant à un système de transcription reconstitué avec des fractions hautement purifiées de TFIIIB, TFIIIC et d'ARN Pol III stimule la transcription des trois types de gènes transcrits par l'ARN Pol III (gènes d'ARNt, viraux, de l'ARNr 5S et de l'ARNsn U6) (Waldschmidt et Seifart, 1992 ; Meissner et al., 1993). Par ailleurs, des analyses d'immunoprécipitations de chromatine (ChIP) avec le facteur TFIIA n'ont pas permis de montrer que ce facteur était présent sur les gènes transcrits par l'ARN Pol III, minorant l'idée d'une implication directe de TFIIA dans la transcription par l'ARN Pol III *in vivo* (Fairley et al., 2005).

Contrairement à TFIIA, le facteur **TFIIIS** est présent sur les gènes transcrits par la Pol III, et des mutations dans ce facteur affectent l'occupation de l'ARN Pol III sur ces gènes (Ghavi-Helm et al., 2008). L'une de ces mutations conduit, dans des conditions de croissance particulières, à une

diminution partielle de la transcription des gènes de classe III. En complément, des transcriptions réalisées *in vitro* montrent que le facteur de transcription TFIIIS aide à la sélection correcte du site d'initiation de la transcription par l'ARN Pol III (Ghavi-Helm et al., 2008). Son rôle dans la transcription *in vivo* par l'ARN Pol III n'est pas encore précisé.

### 1.3.1.2 Nhp6

Un autre stimulateur de la transcription par l'ARN Pol III est également important à l'étape d'initiation : il s'agit de la protéine **Nhp6**. Cette protéine fait partie de la famille des protéines chromatinienne HMG (*high mobility group*), qui se lie de manière non spécifique à l'ADN.

Un premier lien entre Nhp6 et la transcription par l'ARN Pol III a été mis en évidence lors d'un crible génétique visant à supprimer la mutation des gènes *NHP6* (A et B) : le gène codant pour Brf1 (sous-unité de TFIIIB), le gène *SNR6* codant pour l'ARNsn U6 (transcrit par la Pol III) et celui codant pour une forme mutée de la sous-unité  $\tau$ 131 de TFIIIC sont des suppresseurs de la létalité causée par la mutation de Nhp6 (Kruppa et al., 2001). Et à l'inverse, les gènes *NHP6* ont été retrouvés en tant que suppresseurs d'une mutation de *SNR6* (Lopez et al., 2001). Nhp6 est requis pour la transcription efficace de l'ARNsn U6 *in vivo* (Martin et al., 2001) et est également capable de stimuler la transcription du gène *in vitro* reconstituée à partir d'extraits cellulaires bruts dépourvus de Nhp6 ou de fractions purifiées de Pol III et des facteurs de transcription (Kruppa et al., 2001 ; Lopez et al., 2001 ; Braglia et al., 2007).

Nhp6 est important au niveau du promoteur du gène, par sa capacité de structuration de la chromatine (Lopez et al., 2001). Sur le gène *SNR6*, l'occupation de la sous-unité TBP est réduite en l'absence de Nhp6 dans la cellule (Eriksson et al., 2004). Nhp6 est également impliqué dans l'initiation de la transcription d'autres gènes transcrits par la Pol III : dans un système de transcription reconstitué *in vitro* à partir de protéines hautement purifiées, la présence de Nhp6 est requise pour démarrer la transcription du gène d'ARNt<sup>Tyr</sup> *SUP4* au bon site d'initiation. Des analyses d'empreintes à la DNase I suggèrent qu'en absence de Nhp6, la liaison de TFIIIB sur l'ADN est réduite, son positionnement est alors moins précis et entraînerait des initiations à plusieurs sites d'initiation distincts (Kassavetis et Steiner, 2006). Par la suite, l'analyse des ARNt non maturés dans une souche de levure dépourvue de Nhp6 a confirmé sa fonction dans la reconnaissance du site d'initiation de la transcription *in vivo* de certains ARNt. Chez la levure, l'action de Nhp6 sur la transcription des ARNt semble dépendante des séquences en amont du promoteur des gènes : la fixation de TFIIIB au promoteur serait facilitée, par un remodelage local de la chromatine au niveau des séquences promotrices (Giuliodori et al., 2003 ; Braglia et al., 2007).

Enfin, très récemment, une analyse globale de l'occupation du génome de *Saccharomyces cerevisiae* montre que Nhp6 est présent au niveau des gènes d'ARNt (Venters et al., 2011).

### 1.3.1.3 Staf

Ensuite, toujours parmi les stimulateurs de la transcription par l'ARN Pol III, on trouve la protéine **Staf** (pour *selenocysteine tRNA gene transcription activating factor*). Cette protéine a été

découverte dans le modèle batracien *Xenopus laevis*, en tant que stimulateur de la transcription *in vivo* du gène de l'ARNt<sup>Sec</sup> (Schuster et al. 1995). Staf possède un orthologue humain : ZNF143 (Myslinski et al., 1998). Leur rôle dans la stimulation de la transcription d'ARNsn (transcrits par la Pol III) et d'un certain nombre d'ARN transcrits par la Pol II a été mis en évidence (Schaub et al., 1997).

L'activité stimulatrice de la transcription par l'ARN Pol III implique de manière déterminante l'un des sept doigts de zinc de la protéine dans la reconnaissance des séquences SBS (*Staf Binding Sites*) au sein des promoteurs (Schaub et al., 1999a et b). Staf/ZNF143 a également été étudié sous le nom de SBF, pour *SPH-binding factor*, où SPH (*SphI postoctamer homology*) est un autre motif retrouvé dans les promoteurs de type 3 des gènes transcrits par l'ARN Pol III (Kunkel et al., 1996 ; Rincon et al., 1998). Une étude de l'effet de Staf/ZNF143/SBF sur la stimulation de la transcription de l'ARN U6 montre que la protéine s'associe *in vivo* à CHD8, une protéine chromatinienne de la famille des CHD (*chromodomain-helicase-DNA binding*) (Yuan et al. 2007). Cette association est requise non seulement pour une transcription efficace de l'ARN U6 transcrit par l'ARN Pol III mais également pour la transcription par l'ARN Pol II d'un gène, *IRF3* (dont la stimulation de la transcription par Staf/ZNF143 est connue). Cette donnée montre l'intérêt des structures et du remodelage chromatinien au cours de la transcription par l'ARN Pol III.

#### 1.3.1.4 La protéine La, NF1, Topo I et PC4

A la différence des protéines TFIIIS, Staf et Nhp6, qui interviennent au niveau de l'initiation de la transcription par l'ARN Pol III, d'autres protéines sont capables de stimuler cette même transcription *via* l'étape de terminaison et de réinitiation. C'est le cas de la protéine La, des facteurs NF1, de la topoisomérase I et de la protéine PC4.

Initialement, la protéine La (également appelée Lhp1) a été découverte en tant que protéine qui se fixe à la queue des petits ARN néosynthétisés (Rinke et Steitz, 1982 ; Curry et Conte, 2006). Cette protéine ubiquitaire aide à la biogenèse de ces petits ARN, en les protégeant des exonucléases et en facilitant leur assemblage dans des complexes ribonucléoprotéiques, telle une chaperonne (Pannone et al., 1998 ; Maraia et Intine, 2002). La protéine La est également impliquée dans la rétention au noyau de certains de ces ARN et serait impliquée dans la régulation de la traduction de certains messagers (pour revue, Wolin et Cedervall, 2002).

Des analyses de transcription *in vitro* réalisées avec des extraits de cellules humaines HeLa montrent que la protéine La influence l'efficacité de la transcription par l'ARN Pol III : son immunodéplétion conduit à une chute importante de la transcription par l'ARN Pol III, et cette transcription est restaurée lorsque la protéine La est réintroduite (Gottlieb et Steitz, 1989). La stimulation de la transcription par l'ARN Pol III par la protéine La humaine réside d'une part en sa participation à la terminaison de la transcription et à la stabilisation des transcrits dans un système *in vitro* (avec des complexes de transcription pré-assemblés *in vitro*) (Maraia et al., 1994). D'autre part, elle réside également dans son implication dans l'initiation *in vitro* des gènes humains VA1, 7SL et B1 ainsi qu'en sa capacité à stimuler la réinitiation facilitée de la transcription (Maraia, 1996). Ces effets transcriptionnels sont régis par un domaine distinct à celui de la liaison aux ARN néosynthétisés (Goodier et al., 1997). De plus, l'activité stimulatrice de la protéine La humaine requiert la simple déphosphorylation de sa sérine 366, médiée par la caséine kinase II (CK2) (Fan et al, 1997).

Cependant aucune phosphorylation ne semble intervenir dans le cas de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Long et al., 2001). Des expériences de *ChIP* ont pu par ailleurs mettre en évidence la présence de la protéine La sur les gènes transcrits par l'ARN Pol III (Fairley et al., 2005).

Le rôle de la protéine La semble complexe car d'autres études contredisent certaines des observations précédentes qui la décrivent comme un activateur de la transcription par l'ARN Pol III. D'une part, un système de transcription reconstitué *in vitro* à partir de fractions (de cellules humaines HEK) dans lesquelles la protéine La a été immunodéplétée est fonctionnel ; d'autre part, l'addition de protéine recombinante La n'a aucune influence sur l'efficacité de la transcription (Weser et al., 2000). En outre, chez la levure *S. cerevisiae* et le batracien *X. laevis*, la protéine La n'est pas requise pour la transcription par l'ARN Pol III (Yoo et Wolin, 1997 ; Lin-Marq et Clarkson, 1998). Toutefois, l'absence de la protéine La chez *S. cerevisiae* conduit tout de même à l'observation d'un plus grand nombre de Pol sur les gènes codant pour l'ARNr 5S, bien que ni la quantité, ni la qualité de l'ARNr n'en soit affectée (French et al., 2008). La protéine La pourrait participer au relargage efficace de l'ARN Pol III. Les conditions dans lesquelles la protéine La stimule la transcription de gènes par l'ARN Pol III reste donc encore à être clarifiée.

Ensuite, la famille des protéines **NF1** (*Nuclear Factor 1*, également connus sous le nom de CTF pour *CAAT box transcription factor*) représente également un stimulateur de la transcription par l'ARN Pol III. Cette famille de protéines est présente uniquement chez les eucaryotes supérieurs, notamment chez les vertébrés, et intervient dans la réplication d'ADN viral et dans la régulation (notamment en tant qu'activateurs) de nombreux gènes (pour revue, Gronostajski, 2000 ; Pjanic et al., 2011).

Parmi les nombreuses études menées sur cette famille, il a été montré que NF1 est capable de se lier à des séquences en aval du terminateur des gènes VA de l'adénovirus (transcrits par l'ARN Pol III) (Van Dyke et Roeder, 1987). Des études indiquent que ces protéines NF1 sont impliquées dans la terminaison et la réinitiation de la transcription par l'ARN Pol III (Wang et al., 2000). En effet, d'une part, la mutation du site de liaison de NF1 dans le gène VA1 conduit à la terminaison prématurée et à une diminution de l'efficacité de la réinitiation de la transcription. D'autre part, la transcription réalisée à partir d'extraits de cellules HeLa dans lesquels NF1 a été immunodéplété est largement affectée ; l'ajout de NF1 permet de corriger les défauts observés (Wang et al., 2000). Toutefois, malgré la mise en évidence de l'effet de NF1 dans la terminaison de la transcription par l'ARN Pol III *in vitro*, des expériences d'immunoprécipitations de la chromatine n'ont pas permis de détecter NF1 sur les gènes transcrits par la Pol III *in vivo* dans les cellules HeLa (Fairley et al., 2005).

Comme NF1, la **topoisomérase à ADN I** (Topo I) et la protéine **PC4** (*Positive Cofactor 4*) peuvent supprimer le défaut de terminaison de transcription (terminaison prématurée) mis en évidence dans un système de transcription *in vitro* reconstitué avec des fractions hautement purifiées de TFIIB, TFIIC et d'ARN Pol III. Ces protéines permettent d'augmenter la capacité de TFIIC à se positionner sur des gènes de classe III et peuvent stimuler *in vitro* la transcription du gène VAI par l'ARN Pol III en facilitant la terminaison et en favorisant la réinitiation (Wang et Roeder, 1998 ; Wang et al., 2000). Dans notre présente étude, nous nous sommes intéressés à l'interaction de PC4 *in vivo* avec la machinerie de transcription par l'ARN Pol III. De ce fait, la protéine sera décrite plus loin.

### 1.3.1.5 TFIIE et la RNase P

Deux autres éléments modulateurs ont été décrits dans la littérature, TFIIE et la RNase P, dont les mécanismes de stimulation restent encore à être étudiés.

L'activité appelée **TFIIE** est capable d'augmenter la transcription basale par l'ARN Pol III *in vitro* d'ARNt et de l'ARNr 5S. Cette activité avait été mise en évidence chez *S. cerevisiae*, indépendamment des fractions contenant TFIIB et TFIIC (Dieci et al., 1992). Bien que la nature moléculaire et le mode d'action de cette activité n'aient été élucidés, il a été montré que TFIIE co-purifie avec un certain nombre de protéines ribosomales. De manière remarquable, ce groupe de protéines ribosomales est généralement lié aux gènes d'ARNt et de l'ARNr 5S. Et parmi ces protéines ribosomales, certaines sont des suppresseurs de mutations de TFIIC (Dieci et al., 2009). L'étude de TFIIE et de la modulation par des protéines ribosomales de la transcription par l'ARN Pol III reste encore à être approfondie.

La ribonucléoprotéine **RNase P** a d'abord été décrite en tant qu'endoribonucléase responsable de la maturation des précurseurs d'ARNt (pour revue, Altman et al., 2007). D'autres études ont montré par la suite que la RNase P est également impliquée dans des étapes plus précoces de la transcription d'ARNt et de petits ARN non-codants. En effet, la RNase P s'associe directement avec l'ARN Pol III sur les gènes transcrits activement et semble nécessaire pour en obtenir une transcription à un niveau optimal (Reiner et al., 2006 ; Jarrous et Reiner, 2007). La caractérisation de ces deux fonctions de la RNase P suggère que les mécanismes de transcription et de maturation des ARNt (et d'autres petits ARN transcrits par la Pol III) pourraient être coordonnés au sein de la cellule.

### 1.3.1.6 Dr1

Enfin, un exemple de répresseur de la transcription de base est la protéine **Dr1** (*Down-regulator 1*). Cette petite phosphoprotéine est connue pour réprimer globalement les transcriptions par les ARN Pol II et III, en interagissant avec TBP (Kim et al., 1997 ; Schluesche et al., 2007). On sait également que Dr1 (également dénommée NC2 $\beta$ ) se dimérise avec le corépresseur DRAP1 (*Drf1-Associated Protein 1*, également appelée NC2 $\alpha$ ) pour former le complexe Dr1/DRAP1 également appelé NC2 (*Negative Cofactor 2*). De manière intéressante, la surexpression de Dr1 ralentit la croissance cellulaire de la levure et diminue la transcription par l'ARN Pol III (Kim et al., 1997). Et *in vitro*, la protéine Dr1 est capable d'inhiber la transcription des gènes viraux VA et des gènes d'ARNt (White et al., 1994). De plus, alors que Dr1 n'a pas été détecté sur les gènes d'ARNt chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Geisberg et al., 2001), une autre étude montre que Dr1 est présent sur les gènes transcrits par la Pol III (d'ARNt, de l'ARNr 5S et de l'ARNsn U6) dans des cellules humaines HeLa (Kantidakis et White, 2010). Il y est également montré que, de même, DRAP1 s'associe à ces gènes sans toutefois influencer leur expression. Par ailleurs, le répresseur Dr1 s'associe non seulement à TBP mais aussi à Brf1 (Kantidakis et White, 2010) : la répression de la transcription par l'ARN Pol III par Dr1 intervient *via* une interaction avec le facteur TFIIB.

Modulateur	Fonction dans la transcription par l'ARN Pol III	Principales références
TFIIA	stimulateur	Waldschmidt et Seifart, 1992 ; Meissner et al., 1993
TFIIS Nhp6	stimulateur, intervient dans l'initiation stimulateur, intervient dans l'initiation	Ghavi-Helm et al., 2008 Kruppa et al., 2001 Kassavetis et Steiner, 2006 ; Braqlia et al., 2007 ; Giuliiodori et al., 2003
Staf	stimulateur, intervient dans l'initiation	Schuster et al., 1995 ; Schaub et al., 1997
La	stimulateur, intervient dans l'initiation et la terminaison	Gottlieb et Steitz, 1989 ; Maraia et al., 1994 ; Maraia et al., 1996
NF1	stimulateur, intervient dans la réinitiation et la terminaison	Wang et al., 2000
Topo I	stimulateur, intervient dans la réinitiation et la terminaison	Wang et Roeder, 1998 ; Wang et al., 2000
PC4	stimulateur, intervient dans la réinitiation et la terminaison	Wang et Roeder, 1998 ; Wang et al., 2000
TFIIIE	stimulateur	Dieci et al., 1992
RNase P	stimulateur	Reiner et al., 2006 ; Jarrous et Reiner, 2007
Dr1	répresseur	Kim et al., 1997 ; Schluesche et al., 2007

**Tableau 1. Récapitulatif des modulateurs de la transcription par l'ARN Pol III présentés**

Cette liste non exhaustive de modulateurs de la transcription par l'ARN Pol III présente des éléments qui interfèrent directement avec le système de transcription de base, *in vitro* et/ou *in vivo*. Ces modulateurs ne sont pour le moment pas reliés à quelque condition de régulation particulière.

Parallèlement à cette liste, il existe d'autres facteurs capables de moduler la transcription par l'ARN Pol III, en fonction de conditions particulières de régulation. Ces autres éléments de régulation font l'objet du chapitre suivant.

## 1.3.2 La transcription par l'ARN Pol III est régulée *in vivo* en fonction d'autres mécanismes cellulaires

Dans cette partie, nous aborderons plusieurs aspects de la régulation de la transcription par l'ARN Pol III au cœur des cellules, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et dans les cellules humaines.

Nous nous intéresserons d'abord à la régulation de la transcription par l'ARN Pol III en fonction des ressources nutritionnelles. Ensuite, nous verrons dans quelle mesure la transcription par l'ARN Pol III est régulée en fonction du cycle cellulaire et lorsque ce cycle est entravé en réponse à des dommages à l'ADN. Puis nous nous attarderons sur le lien entre l'interruption des voies de sécrétion des protéines et la répression de la transcription par l'ARN Pol III. Pour poursuivre, nous discuterons de la régulation de la transcription par l'ARN Pol III par rapport aux cancers dans des cellules animales. Enfin, nous nous tournerons vers l'influence de la structure de la chromatine des gènes de classe III et de l'occupation de la chromatine environnante sur la transcription par l'ARN Pol III avant d'aborder finalement le cas de la protéine Maf1, le répresseur général de cette transcription.

### 1.3.2.1 Adaptation à l'environnement : la transcription par l'ARN Pol III est régulée par les nutriments

La croissance, augmentation de la masse de la cellule, et la prolifération, augmentation du nombre de cellules, sont directement dépendantes de la disponibilité en nutriments : ceux-ci sont nécessaires en tant que précurseurs métaboliques ou en tant que source d'énergie. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les principales études menées à ce sujet concernent principalement les ressources en carbone et celles en azote. Plusieurs voies de signalisation coexistent et influencent la croissance de la cellule en fonction de ces ressources. On peut aisément comprendre que la présence ou l'absence de certains éléments dans le milieu soit une source de stress et soit soumis à une régulation au sein de la cellule. Quelques données nous permettent de relier l'influence de ces nutriments à la transcription par l'ARN Pol III.

#### 1.3.2.1.1 Carence générale en nutriments et entrée en phase stationnaire

Lorsque les nutriments nécessaires à la croissance ne sont plus disponibles, la levure *Saccharomyces cerevisiae* entre dans un état physiologique particulier appelé phase stationnaire. La cellule ralentit sa croissance puis arrête sa division au stade appelé G<sub>0</sub> du cycle cellulaire. Cet état s'accompagne de diverses modifications physiologiques : la paroi cellulaire s'épaissit, les chromosomes apparaissent plus condensés, le nombre de mitochondries augmente, la cellule accumule des carbohydrates et du glycogène. L'ensemble de ces modifications est supposée permettre à la cellule de survivre au mieux dans le milieu défavorable (Herman 2002 ; Gray et al., 2004 ; Galdieri et al., 2010). On observe, dans cet état de phase stationnaire, que la transcription par les trois ARN Pol diminue (Sebastian et al., 1973).

Bien que les transcrits par l'ARN Pol III ne soient pas limitant à court terme pour la croissance cellulaire, cette transcription par l'ARN Pol III est régulée (Waldron et Lacroute, 1975). En effet, la transcription par l'ARN Pol III est élevée en milieu riche et réprimée en carence en nutriments (Waldron et Lacroute, 1975 ; Clarke et al., 1996). Dans des cellules ayant atteint la phase stationnaire, l'activité transcriptionnelle de l'ARN Pol III est considérablement réduite par rapport à des cellules en phase exponentielle de croissance (Sethy et al., 1995).

Des transcriptions *in vitro* à partir d'extraits de cellules cultivées en phase stationnaire de croissance ont permis d'identifier le facteur TFIIIB comme facteur limitant (Tower et Sollner-Webb, 1988 ; Sethy et al., 1995). Par ailleurs, des expériences d'empreinte à la DNase I (*footprinting*) indiquent que l'ARN Pol III, mais pas TBP, se dissocierait du promoteur des gènes lorsque les cellules entrent en phase stationnaire (Huibregtse et Engelke, 1989). Plus tard, il a été observé par des immunoprécipitations de la chromatine (*ChIP*) analysées sur puces à ADN (*ChIP on chip*) que l'occupation de l'ARN Pol III sur les gènes de classe III diminue, que l'occupation de TFIIIB reste stable (voire diminue légèrement sur certains gènes), et que l'occupation de TFIIIC augmente rapidement lorsque des cellules sont privées de nutriments et tendent vers la phase stationnaire (Harismendy et al., 2003 ; Roberts et al., 2003).

D'autres données concernant la régulation de la transcription par l'ARN Pol III en fonction de la disponibilité des nutriments ciblent plus précisément des voies du métabolisme : parmi elles, on trouve notamment la voie Ras et la voie Tor.

#### 1.3.2.1.2 La voie Ras et la transcription par l'ARN Pol III

La levure *S. cerevisiae* est capable d'obtenir de l'énergie et des précurseurs par la fermentation de sucres. Les sucres utilisés sont nombreux : sucrose, fructose, galactose, maltose, raffinose... le plus connu et répandu étant le glucose. Ces sucres sont convertis en mono-, di- ou trisaccharides par le métabolisme de la glycolyse ou de la gluconéogenèse. En alternative à la fermentation, la levure peut respirer : elle est capable d'oxyder un certain nombre de produits issus de la fermentation tels que le glycérol, l'éthanol et l'acide lactique. Considérant que le glucose est l'élément qui fournit le plus rapidement de l'énergie et des précurseurs à la levure, ce sucre représente un point de régulation non négligeable au cours de la croissance cellulaire et de la prolifération (pour revue, Zaman et al., 2008)

Témoignant de ce rôle-clef du glucose, on a observé que l'ajout de glucose à des cellules cultivées sans source de carbone fermentescible conduit à un remaniement transcriptionnel important du génome en quelques minutes (Wang et al., 2004). Les gènes dont l'expression augmente considérablement correspondent à ceux impliqués dans la genèse des ribosomes tandis que ceux qui sont réprimés correspondent à des gènes requis pour la respiration oxydative et quelques autres gènes impliqués dans le métabolisme d'autres sources de carbone (Wang et al., 2004). A l'inverse, lors du « shift diauxique », étape au cours de laquelle la levure *S. cerevisiae* commence à métaboliser l'éthanol produit par fermentation du glucose qui a été épuisé dans le milieu de culture, la cellule procède à un changement de son métabolisme globalement dirigé vers l'inhibition de la synthèse protéique (DeRisi et al., 1997). De même, lorsque les cellules sont transférées d'une source de carbone fermentescible à une source de carbone non fermentescible, la

reprogrammation transcriptionnelle de leur métabolisme conduit globalement à la répression de la traduction (Ashe et al., 2000).

### La régulation transcriptionnelle en fonction du glucose passe par Ras et la PKA

La voie de régulation du métabolisme en fonction du glucose est relativement bien étudiée. Plusieurs voies de signalisation parallèles ont été caractérisées pour la régulation du glucose. Elles font intervenir indépendamment la kinase Sch9 (abordée dans les paragraphes suivants), le complexe Snf1 ou bien les protéines Rgt (pour revue, Zaman et al., 2008 ; pour article récent, Zaman et al., 2009). Mais les changements opérés par la cellule en fonction du glucose sont principalement dûs à la protéine kinase A (PKA) dont l'activation dépend des protéines Ras (Ras1 ou Ras2) et Gpr1 (Colombo et al., 1998). La voie de signalisation comprenant Ras, une GTPase, et celle comprenant Gpr1, un récepteur couplé à une autre GTPase, sont deux voies différentes nécessaires à la détection du glucose (Wang et al., 2004). Ensuite, en aval, une cascade activant la PKA vient compléter la réponse au glucose : cette voie effectrice de la réponse conduit aux changements métaboliques de la cellule (pour article récent, Slattery et al., 2008 ; pour revue, Thevelein et de Winde, 1999).

L'activité de la PKA est couplée à l'augmentation du niveau d'AMP cyclique (AMPc) (THEVELEIN 1994). C'est l'adénylate cyclase Cyr1 qui est responsable de la production de l'AMPc. Cette adénylate cyclase est activée *via* deux voies de détection du glucose : d'une part *via* la protéine **Ras** (Ras1 ou Ras2) et d'autre part *via* le récepteur Gpr1. Lorsque les deux GTPases Ras (Ras1 et Ras2) fixent le GTP, elles activent l'adénylate cyclase Cyr1. La présence de la forme activatrice Ras-GTP dépend du ratio GTP/GDP contrôlé par le facteur d'échange nucléotidique de guanine Cdc25. Tout en amont de la voie de signalisation par Ras, on trouve finalement le glucose, dont la présence régule l'activité de Cdc25 (Broek et al., 1987 ; Gross et al., 1992). Parallèlement à la voie Ras, la protéine Gpr1 est un récepteur transmembranaire de glucose, et plus largement de sucre fermentescible. Ce récepteur est couplé à la protéine Gpa2, une autre GTPase, qui interagit directement avec l'adénylate cyclase Cyr1 et l'active (Xue et al., 1998). Ainsi, ces deux voies responsables de la détection du glucose conduisent à l'activation de la PKA par l'AMPc et à la régulation de l'expression des gènes en réponse au glucose. On note toutefois que la voie de signalisation par Gpr1 contribue beaucoup moins que la voie Ras à la réponse transcriptionnelle à court terme au glucose (Wang et al., 2004 ; Zaman et al., 2009).

Cette voie Ras, d'abord étudiée avec la PKA par rapport aux changements du métabolisme cellulaire en fonction du glucose disponible, comprend en réalité d'autres voies effectrices impliquées dans la croissance (pour revue, Katz et McCormick, 1997). Nous verrons comment différents éléments de la voie Ras sont impliqués dans la régulation de la transcription par l'ARN Pol III.

### La transcription par l'ARN Pol III est régulée par les éléments de la voie Ras

Alors que cette voie de régulation du glucose par Ras/PKA est clairement connectée à la régulation de la synthèse des protéines nécessaires à la croissance, certains éléments la connectent plus particulièrement à la transcription par l'ARN Pol III. La transcription par l'ARN Pol III peut être stimulée *via* Ras, à travers plusieurs mécanismes.

La transcription par l'ARN Pol III peut être stimulée par l'activation de la voie Ras à travers l'augmentation de l'expression de la protéine TBP (Wang et al., 1997). Deux effecteurs en aval des

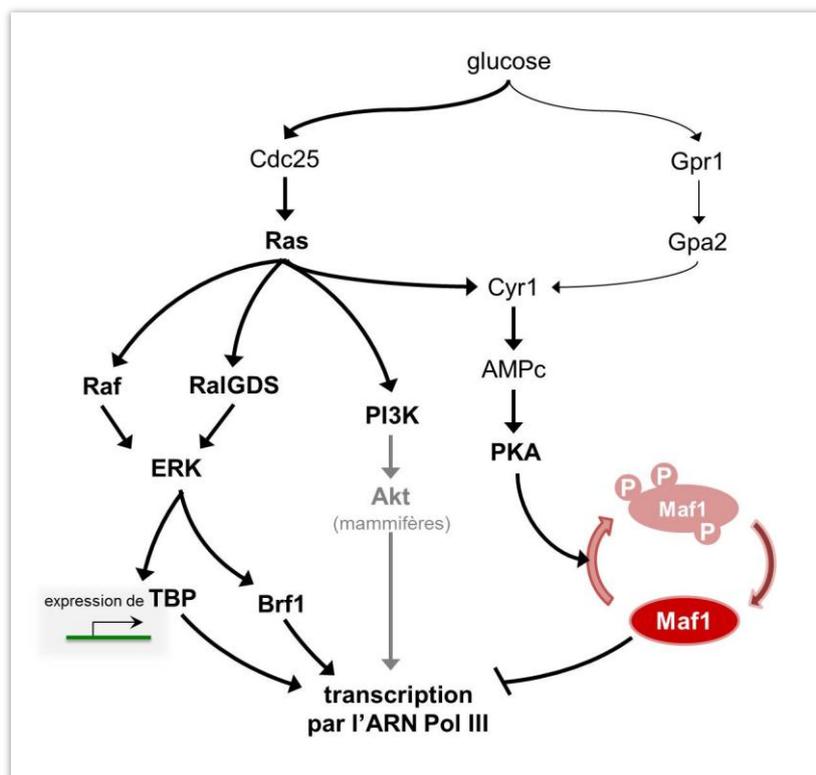
protéines Ras, **Raf** et **RalGDS** (*Ral guanine dissociation stimulator*), sont impliqués dans cet effet : dans des cellules d'hépatocytes, l'expression de ces deux effecteurs stimule les *mitogen-activated kinases* (MAPK) **ERK** (pour *extracellular signal-regulated kinases*) qui induisent l'augmentation de l'expression de TBP malgré l'inactivation de Ras (Johnson et al., 2000).

Un autre mécanisme de stimulation de la transcription par l'ARN Pol III par les kinases ERK a été décrit : les kinases ERK peuvent phosphoryler directement le facteur TFIIB (Stefanovsky et al., 2001 ; Whitmarsh et Davis, 2000). La phosphorylation de la sous-unité Brf1 par ERK favorise la liaison de TFIIB à l'ARN Pol III et stimulerait sa transcription (Felton-Edkins et al., 2003b).

Parallèlement à l'activation des kinases ERK *via* les effecteurs Raf et RalGDS, les GTPases Ras peuvent se lier et activer la *phosphatidylinositol 3-kinase* (**PI3K**) (Rodriguez-Viciano et al., 1994). Chez les mammifères, la PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate qui fixe et active la kinase Akt, également appelée protéine kinase B (PKB). La kinase Akt activée stimule la synthèse protéique et la croissance à travers divers effecteurs dont TORC1 que nous aborderons dans les paragraphes suivants (Engelman et al., 2006 ; Luo et al., 2003 ; Markman et al., 2010). La PI3K participe ainsi non seulement à la croissance mais également à la stimulation la transcription par l'ARN Pol III : dans des cellules humaines, tandis que l'inhibition de la PI3K par la wortmannin, un antifongique, ou la mutation des gènes spécifiant la PI3K ou Akt conduisent à une diminution de la transcription *in vivo* par l'ARN III, l'activation constitutive de la PI3K par transfection d'un vecteur surexprimant Ras conduit au contraire à une augmentation cette même transcription (Woiwode et al., 2008).

Finalement, la **PKA** est capable de réguler la transcription par l'ARN Pol III en phosphorylant le répresseur Maf1, le rendant ainsi inactif (Moir et al., 2006). Nous détaillerons le mode d'action de ce répresseur à la fin de ce chapitre.

Ailleurs, dans la super-famille des petites GTPases « Ras-like », on trouve également la protéine Gtr1, impliquée dans la croissance cellulaire mais dont le mécanisme d'action reste inconnu (Wang et al., 2005). Cette protéine a fait l'objet d'un crible double-hybride qui révèle que Gtr1 s'associe avec Rpc19, une sous-unité commune à l'ARN Pol I et à l'ARN Pol III (Todaka et al., 2005). Des expériences plus approfondies montrent que l'activité transcriptionnelle de ces deux ARN polymérase est réduite dans une souche *gtr1Δ* (Todaka et al., 2005). Cette GTPase « Ras-like » pourrait donc représenter un nouveau point de régulation de la croissance cellulaire par son influence sur les ARN Pol I et III, et de ce fait sur la synthèse des protéines.



**Figure 8. Régulation de la transcription par l'ARN Pol III par la voie Ras**

La voie Ras, qui comprend plusieurs voies effectrices, est la principale voie de régulation du métabolisme par le glucose. La voie PI3K/Akt régule la transcription par l'ARN Pol III chez les mammifères mais aucune donnée similaire n'a été décrite chez la levure. Lorsque le répresseur Maf1 est phosphorylé (« P »), par PKA, il est inactif et ne réprime pas la transcription par l'ARN Pol III.

### 1.3.2.1.3 Régulation de la transcription par l'ARN Pol III par la voie Tor

Parallèlement aux voies précédemment présentées dans la réponse au glucose disponible, la voie Tor (*target of rapamycin*) représente une voie de régulation des nutriments largement caractérisée. La voie Tor a une fonction majeure dans la croissance de la cellule (CRESPO and HALL 2002; POWERS *et al.* 2004). D'abord étudiée par rapport à la réponse d'adaptation aux nutriments (Rohde *et al.*, 2001 ; Rohde *et al.*, 2008), son étude s'étend désormais à la régulation générale des stress et sa cascade de signalisation influence non seulement la croissance cellulaire mais aussi le développement de métazoaires et le vieillissement de mammifères (De Virgilio et Loewith, 2006 ; Wullschleger *et al.*, 2006). La voie Tor est très conservée au cours de l'évolution, des levures aux mammifères en passant par la drosophile, le nématode ou les plantes (Crespo *et al.* 2002 ; Wullschleger *et al.*, 2006 ; Shertz *et al.*, 2010 ; Loewith 2011).

### De la rapamycine aux complexes TORC

La voie Tor a initialement été identifiée par des mutations dans les protéines Tor1 et Tor2, qui confèrent à la cellule une résistance à la rapamycine (Heitman *et al.*, 1991). La rapamycine, découverte sur l'île de Pâques (appelée *Rapa Nui*), est un antifongique produit par la bactérie

*Streptomyces hygroscopicus* (Sehgal et al., 1975 ; Vezina et al., 1975). Sa toxicité requiert son association avec le cofacteur FKBP12 (la peptidyl-prolyl isomérase) encodé par le gène *FPR1* dont la mutation conduit également à la résistance à la rapamycine (Heitman et al., 1991). Les protéines Tor1 et Tor 2 font partie de la famille des sérine/thréonine kinases (Chen et al., 1995 ; Alarcon et al., 1999). Chez la plupart des levures, on trouve les deux gènes *TOR1* et *TOR2* tandis que chez les métazoaires, on ne trouve qu'un seul gène *TOR* (Crespo et al. 2002 ; Wullschleger et al., 2006 ; Loewith 2011). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les deux protéines homologues Tor1 et Tor2 ont 67 % d'identité ; elles ont une taille approximativement de 280 kDa (Helliwell et al., 1994). Plus particulièrement, dans les deux protéines Tor1 et Tor2, une sérine (Ser<sup>1972</sup> et Ser<sup>1975</sup> respectivement) est nécessaire pour l'interaction de la protéine avec le complexe rapamycine•FKBP12 (Stan et al., 1994).

Des purifications biochimiques de chacune des deux protéines Tor1 et Tor2 de la levure ont conduit à l'identification de deux complexes multiprotéiques appelés **TORC1** et **TORC2** (Loewith et al., 2002 ; Wedaman et al., 2003). Ces deux complexes trouvent leurs homologues chez les autres eucaryotes (pour revue, De Virgilio et Loewith, 2006 ; Wullschleger et al., 2006). D'un côté, Tor1 forme avec trois autres protéines (Kog1, Lst8 et Tco89) le complexe TORC1, qui régule la prolifération cellulaire et la transition entre la croissance et l'état de quiescence. D'un autre côté, Tor2 est associée à cinq autres protéines (Avo1, Avo2, Avo3, Bit61 et Lst8) dans le complexe TORC2 qui régule quant à lui l'organisation du cytosquelette d'actine et la polarité de la cellule (Loewith et al., 2002 ; Reinke et al., 2004). Une autre différence caractérise chacun des complexes : TORC1, mais pas TORC2, est inhibé par la rapamycine, ce qui facilite l'étude de TORC1. (Loewith et al., 2002).

La rapamycine n'est pas le seul signal déclenchant la voie Tor bien qu'il soit à l'origine de la découverte des kinases Tor. Plusieurs autres signaux régulent la voie Tor et plus particulièrement le complexe TORC1 : la carence en nutriments et la hausse de la quantité d'AMP, notamment induite par un stress, réduisent l'activité kinase de TORC1 tandis que la présence de facteurs de croissance, chez les animaux, l'active (Hay et Sonenberg, 2004 ; Wullschleger et al., 2006).

### Activation de la voie Tor et régulation de la transcription par l'ARN Pol III

Un traitement à la rapamycine présente les mêmes effets transcriptionnels et physiologiques qu'une croissance sur un milieu pauvre en azote ou en carbone (Heitman et al., 1991). Et tout comme dans les cellules entrant en phase stationnaire, (en phase G<sub>0</sub>), la transcription par l'ARN Pol III est réprimée suite à un traitement à la rapamycine. En effet, la transcription *in vitro* est inhibée à partir d'extraits de cellules traitées (Zaragoza et al., 1998). Cette répression par la rapamycine implique directement la voie Tor : lorsque le gène *FPR1*, qui code pour le cofacteur FKBP12 nécessaire à la toxicité de la rapamycine, est délété, la voie Tor devient insensible à la rapamycine et la répression de la transcription n'a plus lieu (Zaragoza et al., 1998)..

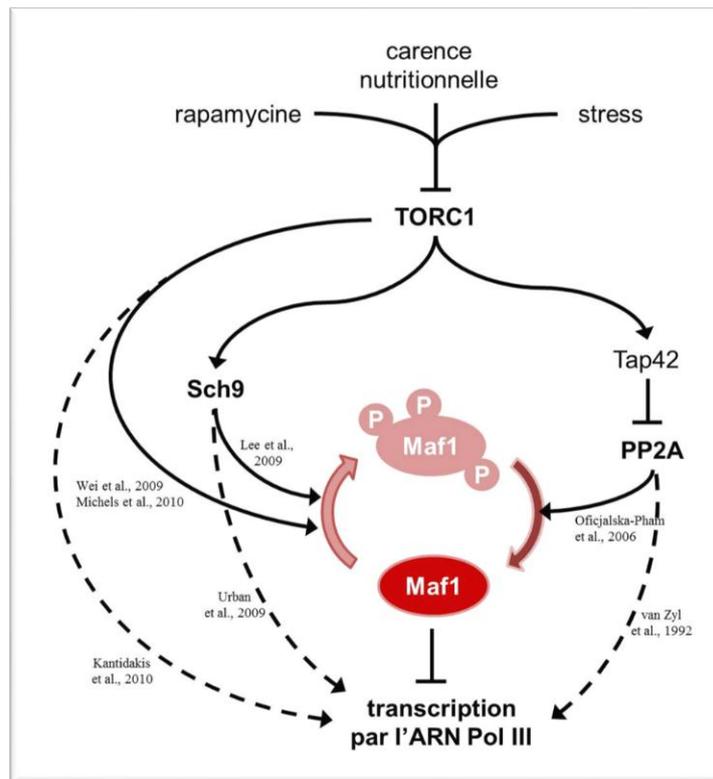
Chez les mammifères, deux substrats de TORC1 ont été bien caractérisés : la protéine 4E-BP (*eucaryotic initiation factor 4E (eIF4E) binding protein*) et la kinase S6K. Ces deux cibles ont des fonctions opposées impliquées dans la traduction des protéines. Alors que la kinase S6K est un régulateur positif de la traduction et est activée par phosphorylation, le facteur 4E-BP en est un inhibiteur et est désactivé par phosphorylation par le complexe TORC1 (Fingar et al., 2002). L'homologue fonctionnel supposé de la kinase S6K chez la levure, Sch9, est phosphorylée de manière similaire par TORC1 et contribue à l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des

protéines, des gènes *Ribi* impliqués dans la biogenèse des ribosomes, et des gènes d'ARNt (Urban et al., 2007). Un traitement à la rapamycine ou une carence en azote ou en carbone conduit à la déphosphorylation rapide de Sch9 et à l'inverse, l'ajout du nutriment en défaut permet la rephosphorylation de Sch9 (Urban et al., 2007). De plus, Sch9 phosphoryle le répresseur Maf1 que nous détaillerons par la suite. La phosphorylation de Maf1 l'inactive et conduit à une inhibition la répression de la transcription par l'ARN Pol III. Dans une souche de levure délétée pour le gène *SCH9*, la transcription par l'ARN Pol III est diminuée. Cependant, lorsque cette souche est traitée à la rapamycine, la répression de la transcription est encore possible (Huber et al., 2009; Lee et al., 2009). La voie Tor en réponse à la rapamycine ne régule donc pas la transcription par l'ARN Pol III uniquement via Sch9.

Plus en aval, TORC1 affecte l'activité de la phosphatase 2A (PP2A). TORC1 phosphoryle la protéine Tap42 qui se fixe alors aux sous-unités catalytiques Pph21 et Pph22 de la PP2A, et Sit4 de la phosphatase « *PP2A-like* » (Di Como et al., 1996 ; Jiang et Broach, 1999 ; Düvel et Broach, 2004). Lorsque la protéine Tap42 est liée à ces sous-unités, les autres sous-unités des phosphatases ne peuvent plus s'assembler. Suite à un traitement à la rapamycine ou à une carence en azote, l'activité de TORC1 est réduite et Tap42 est déphosphorylée : Tap42 libère les sous-unités catalytiques des phosphatases qui vont médier l'inhibition de la croissance (Di Como et al., 1996 ; Jiang et Broach, 1999). Une fois libérée, Sit4 déphosphoryle le facteur de transcription Gln3 qui induit la transcription des gènes en réponse à une carence nutritionnelle (Beck et Hall, 1999 ; Düvel et al., 2003). De même, lorsque la PP2A est activée, les facteurs de transcription Msn2 et Msn4 s'accumulent dans le noyau et induisent l'expression des gènes STRE en réponse à un stress (Görner et al., 2002 ; Santhanam et al., 2004). Parallèlement, la PP2A régule la transcription par l'ARN Pol III. En effet, l'inactivation par mutation de la sous-unité régulatrice Tpd3 de la PP2A résulte en une inhibition de la synthèse des ARNt *in vivo* et *in vitro*, à partir d'extraits cellulaires, chez *Saccharomyces cerevisiae* (van Zyl et al., 1992). Cette inhibition de la transcription fait également intervenir le répresseur Maf1. Lorsque Maf1 est déphosphorylé par la PP2A, il est activé et réprime la transcription par l'ARN Pol III. Des mutations altérant l'activité de la PP2A empêchent la déphosphorylation de Maf1 qui devient incapable de réprimer la transcription en présence de rapamycine (Oficjalska-Pham et al., 2006).

Outre la régulation de la transcription par l'ARN Pol III *via* Sch9 et PP2A, TORC1 est également capable de phosphoryler directement Maf1 *in vivo* et *in vitro* et de réguler la transcription par l'ARN Pol III (Wei et al., 2009 ; Michels et al., 2010). Par ailleurs, la protéine mTor humaine a été retrouvée liée sur les gènes transcrits par l'ARN Pol III (Kantidakis et al., 2010). La protéine mTor interagit non seulement avec le répresseur Maf1 de la transcription par l'ARN Pol III, mais également avec le facteur TFIIC : mTor pourrait finalement phosphoryler et réguler directement la machinerie de transcription (Kantidakis et al., 2010).

Ainsi, la transcription par l'ARN Pol III est régulée par la voie Tor, directement ou indirectement *via* Sch9 et/ou *via* la PP2A. Moins bien caractérisé que TORC1, le complexe TORC2 phosphoryle et active notamment la kinase Akt/PKB (*protein kinase B*) qui est impliquée dans la prolifération cellulaire et dans l'apparition de cancers et du diabète (Sarbasov et al., 2005a et b). Jusqu'à récemment, peu de substrats des deux complexes avaient été identifiés, mais l'analyse actuelle du phosphorylome de TORC1 et TORC2 pourrait indiquer de nouvelles cibles potentielles (Hsu et al., 2011).



**Figure 9. Régulation de la transcription par la voie Tor**

Les flèches en pointillés représentent les éventuelles régulations de TORC1, Sch9 et PP2A directement sur la machinerie de la transcription par l'ARN Pol III. Les références concernant la régulation de la transcription par l'ARN Pol III par les éléments de la voie Tor sont indiquées à côté des flèches. Lorsque le répresseur Maf1 est phosphorylé (« P »), par Sch9 ou TORC1, il est inactif. Lorsqu'il déphosphorylé, par la PP2A, il est activé et réprime la transcription par l'ARN Pol III.

### 1.3.2.2 La transcription par l'ARN Pol III et le cycle de division cellulaire

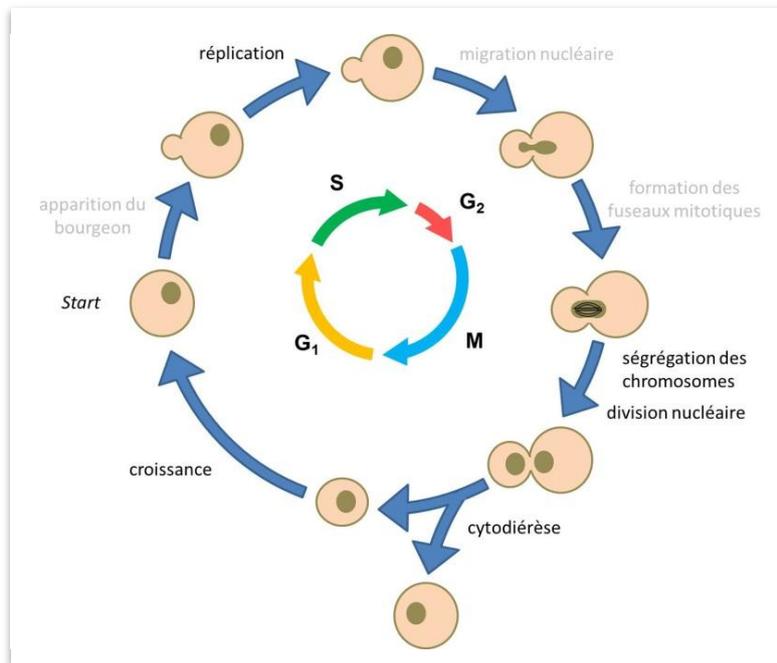
La division cellulaire est donc toute aussi importante que la croissance pour la prolifération cellulaire. Elle conduit à l'obtention de deux cellules au matériel génétique identique.

Généralement, le cycle cellulaire se définit par la succession des phases suivantes (figure 10) :

- la phase pré-réplivative  $G_1$  (*gap* ou *growth 1*) est une phase de croissance au cours de laquelle la cellule prépare la réplication de son génome,
- la phase S (*synthèse*) durant laquelle a lieu la réplication de l'ADN,
- la phase post-réplivative  $G_2$  (*gap* ou *growth 2*), deuxième phase de croissance, très réduite chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, où la cellule prépare sa mitose,
- la phase M (*mitose*), où se déroule à la fois la division du noyau et des chromosomes et la division du cytoplasme cellulaire.

Par ailleurs, il existe pour un certain nombre de cellules un état supplémentaire  $G_0$ , qui correspond à un état de latence (appelé quiescence), où la cellule ne se divise pas. Chez la levure *S. cerevisiae*, les cellules entrent en  $G_0$  pendant la phase stationnaire de croissance et peuvent

réintégrer le cycle cellulaire dans des conditions de croissance appropriées. Nous avons déjà abordé précédemment les aspects de la transcription par l'ARN Pol III par rapport à cette phase stationnaire.



**Figure 10. Cycle cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae***

La croissance et la division cellulaire sont toutes les deux nécessaires à la prolifération des cellules et sont en réalité coordonnées. Lorsque la croissance de la cellule est altérée, la cellule restera trop petite pour être capable de se diviser (Calvert et Dawes, 1984 ; Day et al., 2004), ce qui conduit à l'arrêt de la prolifération. Une taille minimale de la cellule doit être atteinte avant l'initiation de tout cycle de division. Chez la levure *S. cerevisiae*, cette taille-seuil varie en réalité en fonction des conditions environnementales : l'entrée dans le cycle de division peut être initiée dans des cellules très petites lorsqu'elles sont cultivées dans des milieux pauvres, et dans des cellules de taille relativement grande lorsque les milieux sont riches (Guo et al., 2004 ; Stuart et al., 2008).

La croissance influence donc directement la progression dans le cycle de division cellulaire et est limitante pour la prolifération. Cependant, l'inverse n'est pas vrai : la division cellulaire n'est pas limitante pour la prolifération. En effet, il existe des mutants thermosensibles arrêtés à différents stades précis du cycle de division cellulaire (mutants *cdc* pour *cell division cycle*) mais qui continuent de synthétiser des protéines et de croître, alors que des cellules dont la croissance est bloquée arrêtent de se diviser (Johnston et al., 1977). Dans des conditions où la croissance est inhibée (par exemple en carence nutritionnelle comme nous l'avons vu précédemment), la transcription est réprimée. Qu'en est-il par rapport au cycle cellulaire ? Nous verrons que la progression dans le cycle cellulaire régule la transcription par l'ARN Pol III dans une certaine mesure. Puis nous aborderons la transcription par l'ARN Pol III dans des cas où le cycle est arrêté.

### 1.3.2.2.1 Quelques données sur la transcription par l'ARN Pol III au cours du cycle cellulaire

Des analyses à grande échelle sur puces à ADN portant sur l'expression des gènes au cours des différentes phases du cycle cellulaire indiquent que la plupart des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes ont leur expression induite au début de la phase G<sub>1</sub>, avant l'entrée en phase S du cycle cellulaire (Spellman et al., 1998). La transcription par l'ARN Pol III est-elle plus sollicitée à ce moment du cycle ?

Un premier élément de réponse est donné par des études réalisées dans les années 1960 : il a été observé que la synthèse de tous les ARN était réprimée en mitose dans des cellules HeLa (Taylor, 1960 ; Prescott et Bender, 1962 ; Terasima et Tolmach, 1963 ; Johnston et Holland, 1965). Quelques études dans d'autres organismes modèles soutiennent l'existence de cette répression transcriptionnelle mitotique : chez la fève *Vicia faba* (Davidson, 1964), chez le myxomycète *Physarum polycephalum* (Fink et Turnock, 1977), chez le xénope (Newport et Kirschner, 1984) et chez la drosophile (Edgar et Schubiger, 1986), où l'absence de transcription au cours des premiers stades du développement embryonnaire coïncide avec une alternance rapide de mitoses et de phases S. Cette répression mitotique pour l'ARN Pol III est reproductible *in vitro* avec des extraits d'œufs de *Xenopus laevis* synchronisés en phase M du cycle cellulaire (Hartl et al., 1993). Par la suite, l'hypothèse qui suggérerait qu'un état chromatinien particulier soit responsable de cette répression mitotique de la transcription par l'ARN Pol III a été écartée : ni la modification de la chromatine, ni l'ajout de chromatine issue de cellules non mitotiques ne parviennent à restaurer la transcription à partir des extraits mitotiques (Hartl et al., 1993). C'est donc une modification au niveau de la machinerie de transcription par l'ARN Pol III qui serait à l'origine de la répression mitotique.

Partant de cette nouvelle hypothèse, des études portant sur des phosphorylations visant la machinerie de transcription par l'ARN Pol III ont été réalisées. Il apparaît alors que des kinases dépendantes du cycle (cdk, pour *cyclin-dependent kinases*) inhibent la transcription par l'ARN Pol III *in vitro* lorsqu'elles sont extraites d'œufs de xénope arrêtés en mitose ((HARTL *et al.* 1993) ; Gottesfeld et al., 1994). En particulier, la kinase **Cdc2** (dont l'homologue est Cdc28 chez la levure, essentielle à la progression du cycle cellulaire) est requise pour déclencher cette répression, mais la présence d'un inhibiteur de cette kinase n'empêche pas la répression de la transcription des gènes d'ARNt : d'autres kinases seraient également impliquées dans ce contrôle de la transcription. Remarquablement, l'addition de TFIIB purifié à partir d'extraits en interphase peut restaurer la transcription inhibée par Cdc2, tandis qu'un TFIIB extrait de cellules mitotiques ne change rien (GOTTESFELD *et al.* 1994). Ainsi, le facteur de transcription TFIIB est la cible des phosphorylations de la kinase Cdc2 qui conduisent à la répression mitotique. D'autres études portant sur les sous-unités du facteur TFIIB précisent son rôle dans cette répression mitotique. Dans des extraits mitotiques de cellules HeLa, la sous-unité Brf1 est hyperphosphorylée, ce qui entraînerait la déstabilisation de l'interaction entre Brf1 et Bdp1 et conduirait au départ de Bdp1 de l'ADN (Fairley et al., 2003). L'ajout de Brf1 ou de Bdp1 recombinants, mais pas de TBP, rétablit la transcription réprimée dans des extraits mitotiques (FAIRLEY *et al.* 2003). La répression mitotique serait donc médiée par la phosphorylation de Brf1 qui déstabiliserait le complexe protéique TFIIB empêchant ainsi le recrutement de l'ARN Pol III et la transcription.

D'autres kinases sont capables de cibler la machinerie de transcription par l'ARN Pol III. Par exemple, la **CK2** (*casein kinase 2*) est une kinase mitotique capable de stimuler la transcription par l'ARN Pol III *in vitro* réalisée à partir d'extraits purifiés de cellules HeLa (Hockman et Schultz., 1996). La CK2 est d'ailleurs retrouvée sur les gènes d'ARNt (Graczyk et al., 2011). Cette kinase est nécessaire pour la progression du cycle cellulaire, pendant les phases G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>/M (HANNA *et al.* 1995). Chez la levure *S. cerevisiae*, la CK2 s'associe et phosphoryle la protéine TBP, permettant ainsi une meilleure stabilisation de TFIIB sur l'ADN *in vitro* (GHAVIDEL and SCHULTZ 1997 ; GHAVIDEL and SCHULTZ 2001). Toutefois, la phosphorylation par la CK2 présente des effets contradictoires sur le système de transcription de l'ARNsn U6 reconstitué *in vitro* avec des facteurs de transcription recombinants et de Pol III purifiée à partir de cellules HeLa : en effet, alors que la phosphorylation de l'ARN Pol III est requise pour la transcription, la phosphorylation de TFIIB peut la réprimer (HU *et al.* 2003). Alors que l'inhibition de la CK2 dans des extraits mitotiques restaure la transcription par l'ARN Pol III, son inhibition dans des extraits de phase S réprime la même transcription (HU *et al.* 2004). La kinase CK2 phosphoryle les sous-unités Bdp1 et préalablement Brf1 au cours de la mitose, d'où la répression mitotique (JOHNSTON *et al.* 2002). Tandis qu'en phase S la cible de la CK2 semble être l'ARN Pol III, dont la phosphorylation stimule la transcription. Le fait que la CK2 puisse cibler différents éléments de la machinerie de transcription par l'ARN Pol III en fonction des phases du cycle cellulaire soulève encore aujourd'hui une interrogation : comment la CK2, constitutivement exprimée, est-elle redirigée vers ses différentes cibles en fonction du cycle ?

Chez les mammifères, la transcription par l'ARN Pol III est également régulée par la protéine **Rb** (*retinoblastoma*). Rb est capable d'empêcher spécifiquement le facteur TFIIB d'interagir avec TFIIC et l'ARN Pol III (Sutcliffe et al., 2000), en s'y liant pendant la phase G<sub>0</sub> et la phase précoce de G<sub>1</sub> (*early G<sub>1</sub>*) (Scott et al., 2001). Cette interaction entre Rb et TFIIB diminue lorsque les cellules s'approchent de la phase S. L'activité transcriptionnelle maximale de l'ARN Pol III est atteinte en milieu de G<sub>1</sub>, lorsque Rb est phosphorylée par des kinases qui dépendent de cyclines. TFIIB s'associant uniquement avec la forme déphosphorylée de Rb, on a pu observer que la surexpression de ces cyclines conduisent à la stimulation *in vivo* de la transcription par l'ARN Pol III (Scott et al., 2001). Chez les mammifères, la transcription par l'ARN Pol III est donc clairement régulée par la protéine Rb en fonction du cycle cellulaire.

A ce jour, en dehors de l'étude de la répression transcriptionnelle durant la mitose, peu de données concernent l'état de la machinerie de transcription par l'ARN Pol III au cours des autres phases du cycle cellulaire. Des expériences de marquage de certains transcrits de gènes de classe III dans des cellules HeLa montrent que l'activité transcriptionnelle de la Pol III *in vivo* reste faible en sortie de mitose et augmente lorsque les cellules progressent en G<sub>1</sub> vers la phase S (White et al., 1995b). Dans la même étude, l'hypothèse qu'un inhibiteur de la transcription soit présent au cours de la phase précoce de G<sub>1</sub> a été écartée : le mélange d'extraits de cette phase avec des extraits d'autres phases (S ou G<sub>2</sub>) ne conduit pas à une baisse de l'activité transcriptionnelle mais plutôt à une transcription au moins aussi élevée qu'avec des extraits des phases S ou G<sub>2</sub>. Par ailleurs, la transcription reconstituée *in vitro* à partir d'extraits de cellules en G<sub>1</sub> peut être stimulée de la même manière que pour des extraits de cellules mitotiques : l'ajout de TFIIB, mais pas de TFIIC ni de TFIIA, stimule la transcription. Plus précisément, l'ajout des sous-unités Brf1 et Bdp1 associées à TBP, mais pas TBP lui-même, conduit à cette stimulation. Par contre, l'activité transcriptionnelle de la Pol III atteint son niveau maximal au cours de la phase S et de la phase G<sub>2</sub> et n'est pas stimulée de la même

manière (White et al., 1995b). Une dernière donnée issue de la même étude indique que l'ajout de TFIIC, mais pas de TFIIB, à des extraits de cellules en phase S ou G<sub>2</sub> stimule la transcription *in vitro* par la Pol III du gène viral VAI (White et al., 1995b). Ainsi le facteur limitant de la transcription par l'ARN Pol III au cours des phases S et G<sub>2</sub> pourrait cette fois être le facteur TFIIC.

En conclusion, la régulation de la transcription par l'ARN Pol III au cours du cycle cellulaire, surtout étudiée chez les mammifères, semble principalement reposer sur la déstabilisation de TFIIB au cours de la mitose. D'autres mécanismes impliquant TFIIC semblent exister mais ne sont pas encore élucidés. A ce jour, l'étude chez la levure de la régulation de la transcription par l'ARN Pol III au cours du cycle cellulaire reste relativement inexploree et ne trouve pas d'équivalents aux mécanismes spécifiques décrits chez les mammifères.

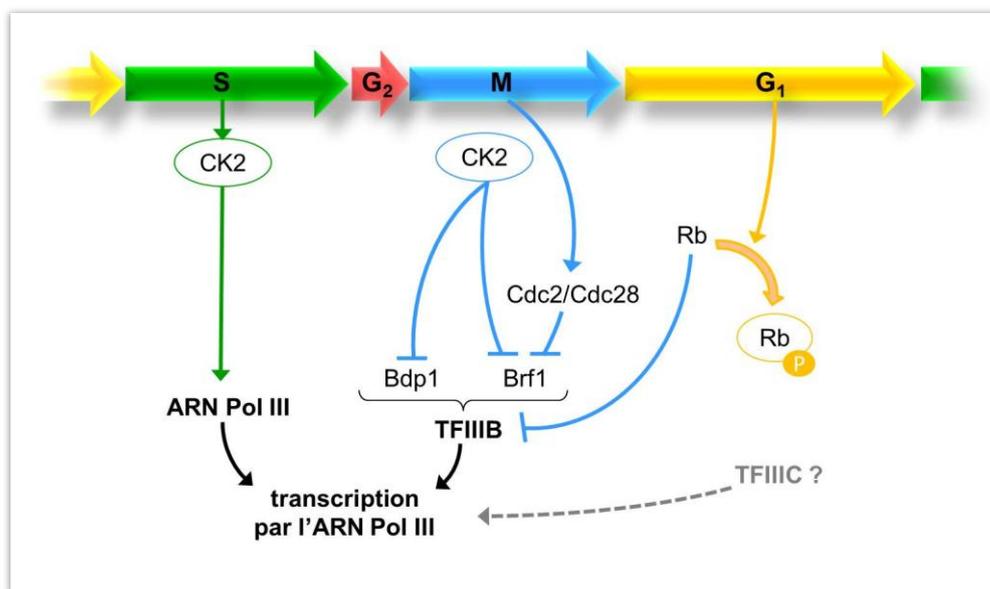


Figure 11. La transcription par l'ARN Pol III est régulée au cours du cycle cellulaire

### 1.3.2.2.2 Que devient la transcription par l'ARN Pol III lorsque la cellule arrête sa division ?

Chaque cycle de division cellulaire mène à la fois à une réplication de l'ADN et à une mitose, garantes de l'obtention de deux cellules-filles identiques. Afin d'assurer l'intégrité de ces deux étapes, la cellule est capable d'arrêter sa progression à travers le cycle cellulaire lorsqu'un problème survient. Ce sont les mécanismes appelés « *checkpoints* » (littéralement « points de contrôle ») qui régissent ce contrôle tout au long du cycle de division cellulaire. Les *checkpoints* sont des cascades de transduction du signal capables de recenser la présence d'un dommage à l'ADN (stress génotoxique) ou d'un blocage de la réplication (stress d'origine répliative). Ces voies de signalisation sont actives tout au long du cycle cellulaire et coordonnent les différentes réponses aux dommages de l'ADN : arrêt du cycle, activation des mécanismes de réparation, ou bien apoptose (Hartwell et Weinert

1989). Les voies de transduction de signal des *checkpoints* reposent sur trois catégories de protéines : d'abord les « senseurs » qui reconnaissent les différents types de défauts et activent la voie de signalisation, ensuite les « adaptateurs » qui transduisent le signal jusqu'aux « effecteurs » de la réponse aux dommages de l'ADN (Melo et Toczyski, 2002). Aujourd'hui encore, de nombreuses voies de signalisation connectant ces protéines des *checkpoints* avec les événements du cycle cellulaire restent à être élucidées.

Lorsque la levure subit un dommage à l'ADN par le méthanesulfonate de méthyle (MMS) ou par irradiation aux ultra-violets (UV) qui causent des lésions de l'ADN, on observe que les ARNt non épissés s'accumulent dans le noyau, au lieu d'être exportés et maturés dans le cytoplasme. En effet, la transduction du signal de dommage à l'ADN passant par la kinase-senseur Mec1 et la kinase-effecteur Rad53 conduit à la relocalisation de la protéine Los1, une protéine du pore nucléaire responsable de l'export des ARNt (Ghavidel et al., 2007). L'accumulation des ARNt non épissés déclenche alors l'activation du facteur de transcription Gcn4 qui réprime la synthèse des protéines ribosomales et active la transcription de gènes spécifiques en réponse aux stress (Qiu et al., 2000 ; Ghavidel et al., 2007). La croissance étant ainsi inhibée, l'activation de Gcn4 contribue à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub> (Hinnebusch et Natarajan, 2002). L'ARNt est ici considéré comme un élément intermédiaire d'une voie de signalisation, entre la perception du dommage à l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire en réponse au dommage. Toutefois, à ce jour, aucune information n'indique que l'accumulation des ARNt non épissés lors d'un dommage à l'ADN puisse réguler leur propre synthèse par l'ARN Pol III. Dans ce cas, qu'advient-il de la transcription par l'ARN Pol III ? Est-elle coordonnée à l'arrêt du cycle cellulaire et/ou à la réponse aux dommages à l'ADN ?

La transcription par l'ARN Pol III est réprimée par un traitement génotoxique au MMS ou par irradiation aux UV (Ghavidel et Schultz, 2001). Ces deux traitements entraînent une forte diminution de la synthèse des ARNt et des ARNr, sans que ceci ne soit une conséquence indirecte de l'arrêt du cycle cellulaire contrôlé par un *checkpoint* de l'ADN : le traitement au MMS dans des mutants de levures arrêtés à différents stades du cycle (mutants *cdc* arrêtés en G<sub>1</sub> ou G<sub>2</sub>/M) présente le même effet répressif sur la transcription (Ghavidel et Schultz, 2001). On retrouve également cette répression dans des transcriptions réalisées *in vitro* à partir d'extraits de levures traitées au MMS mais avec de l'ADN intact. De plus, le mélange d'extraits traités et non traités ne révèle pas la présence d'un inhibiteur qui serait responsable de cette répression. C'est en réalité le facteur TFIIB qui est la cible de la répression au cours de ces dommages à l'ADN : la transcription à partir d'extraits de cellules traitées est restaurée par l'addition de TFIIB purifié de cellules non traitées (Ghavidel et Schultz, 2001).

Par ailleurs, la même étude ajoute que l'interaction entre la sous-unité TBP de TFIIB et la caséine kinase 2 (CK2) est une des cibles de cette régulation transcriptionnelle (Ghavidel et Schultz, 2001). Nous avons vu précédemment que l'activité kinase de la CK2 stimule la transcription par l'ARN Pol III lorsqu'elle est associée à TBP (Ghavidel et Schultz, 1997 ; Ghavidel et al., 1999 ; Johnston et al., 2002). Dans des cellules traitées au MMS ou aux UV, la diminution de cette activité kinase de la CK2 correspond à la dissociation entre la sous-unité catalytique de la CK2 et TBP. Ainsi, l'interaction CK2•TBP participe à la transduction du signal de ces dommages à l'ADN qui mène à la répression de la transcription par l'ARN Pol III. D'autres effecteurs de la réponse aux dommages à l'ADN peuvent

également cibler TFIIB, car la CK2 seule ne permet pas de restaurer la transcription *in vitro* à partir d'extraits de cellules traitées aussi efficacement que TFIIB (Ghavidel et Schultz, 2001).

Lorsque la réplication est inhibée par l'hydroxyurée (HU), la transcription par l'ARN Pol III est également réprimée (Upadhyaya et al., 2002 ; Nguyen et al., 2010). Dans ces conditions, l'expression de sous-unités de l'ARN Pol III, de TFIIB et de TFIIC ne semble pas varier. Par contre, l'occupation de l'ARN Pol III et de TFIIB sur un gène transcrit par l'ARN Pol III diminue (Nguyen et al., 2010). Parallèlement, le facteur TFIIC est associé avec le répresseur Maf1 (Nguyen et al., 2010). L'intervention du répresseur Maf1 au cours de la répression par HU est confirmée par l'inactivation du gène *MAF1* qui conduit à une atténuation de la répression de la transcription des gènes de classe III et à une sensibilité accrue à HU (Nguyen et al., 2010 ; Upadhyaya et al., 2002). Nous aborderons plus tard les modalités d'action de Maf1, répresseur général de la transcription par l'ARN Pol III.

Nous avons vu que la transcription des ARNt semble fortement réprimée suite à un stress génotoxique au MMS ou à HU (Ghavidel et Schultz, 2001). Ce n'est toutefois pas le cas lorsque des cassures de l'ADN sont provoquées par la bléocine ou par des irradiations aux rayons  $\gamma$  (Nguyen et al., 2010). La répression de la transcription des ARNt semble donc spécifiquement couplée à seulement certains stress génotoxiques comme le MMS et le rayonnement UV qui impactent plus particulièrement sur la réplication de l'ADN (Alcasabas et al., 2001). En réalité, un certain *checkpoint* contrôle la transcription des ARNt : le *checkpoint* concerné est la voie qui comprend spécifiquement la kinase-senseur Mec1, l'adaptateur Mrc1 et la kinase-effecteur Rad53, mais pas celle qui contient Tel1 et Rad9, généralement dédiées à la détection des cassures double brin mais pas des défauts de réplication. La délétion chez *Saccharomyces cerevisiae* des gènes *MEC1*, *MRC1* et *RAD53* induit la synthèse du pré-ARNt<sup>Leu</sup>, tandis que la délétion des gènes de *checkpoint* *TEL1* et *RAD9* n'ont pas d'impact sur cette transcription (Nguyen et al., 2010). De plus, la déphosphorylation et l'inactivation du répresseur Maf1 dépendrait de l'induction de l'expression de Rad53 dans les cellules traitées à l'HU (Nguyen et al., 2010). Ainsi, les trois protéines du *checkpoint* Rad53, Mrc1 et Mec1, qui sont exprimées tout au long du cycle cellulaire, contrôlèrent la répression de la transcription des ARNt. Finalement, un traitement au MMS ou à l'HU dans des cellules  $\Delta rad53$ ,  $\Delta mec1$  ou  $\Delta mrc1$  accentue la répression de la transcription des ARNt observée dans des mutants non traités (Nguyen et al., 2010). La transcription par l'ARN Pol III serait donc régulée non seulement tout au long du cycle cellulaire mais également ponctuellement en réponse au dommage à l'ADN par au moins un *checkpoint*.

Une dernière observation reliant la transcription par l'ARN Pol III au cycle cellulaire reste en suspens : chez *Saccharomyces cerevisiae*, des mutations dans les gènes *RPC53* et *RPC160*, codant respectivement pour les sous-unités C53 et C160 de l'ARN Pol III, conduisent non seulement à un arrêt de la synthèse des ARNt, mais également à un arrêt des cellules en phase G<sub>1</sub> (Mann et al., 1992). Est-ce un produit de la transcription par cette ARN Pol III modifiée qui serait directement impliqué dans la progression du cycle de division cellulaire ? Existe-t-il un *checkpoint* vérifiant l'intégrité de la machinerie de transcription par l'ARN Pol III ? Ou bien l'arrêt du cycle est-il une conséquence indirecte de l'altération de la croissance ?

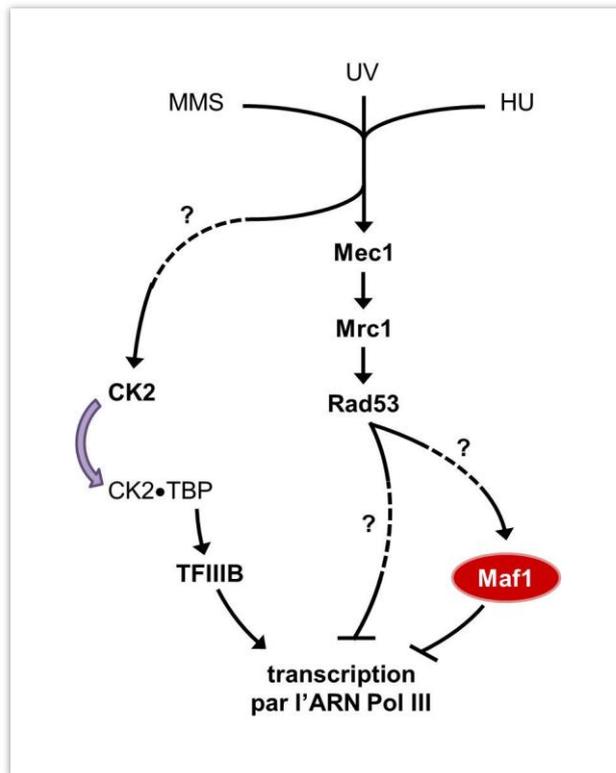


Figure 12. La transcription par l'ARN Pol III est régulée par des protéines de *checkpoint*

### 1.3.2.3 La pression cellulaire interne régule la transcription par l'ARN Pol III

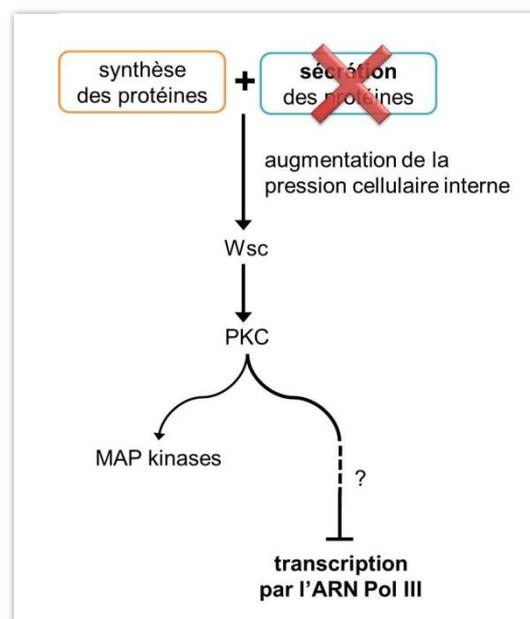
Dans les cellules eucaryotes, les protéines sont synthétisées puis acheminées depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à l'appareil de Golgi où elles sont triées puis secrétées si nécessaire hors de la cellule. Ce cheminement constitue la voie de sécrétion des protéines (pour revue, Prydz et al., 2008). L'interruption de cette voie de sécrétion est considérée comme un stress intracellulaire et inhibe la synthèse des ribosomes qui sont essentiels à la croissance cellulaire (Mizuta et Warner, 1994 ; Li et Warner, 1996). Par ailleurs, un défaut dans cette voie de sécrétion conduirait à l'accumulation des protéines et à l'augmentation de la pression cellulaire interne. Dans ce cas, la cellule active une voie de signalisation particulière visant à préserver l'intégrité de la cellule (Nanduri et al., 2001). L'une des réponses cellulaires mise en œuvre est la répression de la transcription par l'ARN Pol III.

Lorsque la voie de sécrétion est affectée, la transcription par l'ARN Pol III est réprimée. C'est le cas, par exemple, dans des levures portant des mutations *sec* (pour *secretory pathway*) où la voie de sécrétion des protéines est interrompue (Mizuta et al., 1994). Un traitement à la bréfeldine A, un inhibiteur du transport vésiculaire des protéines, arrête également la voie de sécrétion des protéines (pour article récent, Nebenführ et al, 2002). Or dans des mutants *sec* ou bien dans des cellules traitées à la bréfeldine A, on observe une répression de la transcription par l'ARN Pol III (Li et al., 2000).

D'autres traitement comme ceux à la tunicamycine ou au chlorpromazine conduisent également à une répression de la transcription par l'ARN Pol III (Gokal et al., 1986 ; Dieci et al.,

1995 ; Li et al., 2000 ; Upadhyya et al., 2002). La tunicamycine inhibe les glycosylations des protéines, empêchant ainsi la maturation des protéines et le renouvellement des protéines de la membrane plasmique, tandis que le chlorpromazine s'insère dans la membrane plasmique et provoque son étirement (Sheetz et Singer, 1974 ; Kamada et al., 1995). Les deux drogues mènent finalement à des conséquences physiologiques similaires : la pression cellulaire interne augmente, représentant alors un stress pour la cellule elle-même.

Des éléments plus en amont de la voie de sécrétion contrôlent la répression de la transcription par l'ARN Pol III. Ces éléments font partie de la voie de l'intégrité de la cellule qui réagit aux défauts de pression cellulaire interne et aux défauts de la membrane plasmique. Lorsque la voie de sécrétion des protéines est interrompue, la voie de l'intégrité de la cellule devient nécessaire pour la répression de la transcription par l'ARN Pol III (Li et al., 2000). Ce sont les protéines de la famille *Wsc* (*cell wall integrity and stress response component*) et la protéine kinase C (PKC) qui participent au maintien de l'intégrité de la cellule lorsque la membrane cytoplasmique ou la paroi cellulaire sont endommagées (Nanduri et al., 2001). La délétion chez la levure du gène codant pour la PKC dans un mutant *sec* atténue fortement la répression de la transcription d'un ARN<sup>t<sup>Lys</sup></sup> (Li et al., 2000). De même, la délétion conjointe de *WSC1* avec *WSC2* ou de *WSC1* avec *WSC3* bloque la répression de cette transcription dans des cellules traitées à la tunicamycine (Li et al., 2000). Cependant, la délétion des gènes *BCK1* ou *SLT2* codant pour des MAP kinases intervenant en aval des protéines *Wsc* et de la PKC n'empêche pas la répression de cette transcription en présence de tunicamycine (Li et al., 2000). Il existe donc une voie effectrice de l'intégrité de la cellule indépendante des MAP kinases *Bck1* et *Slr2* qui conduit à la régulation de la transcription des gènes de classe III.



**Figure 13. Régulation de la transcription par l'ARN Pol III par pression cellulaire interne**

Lorsque les protéines ne sont plus sécrétées alors que leur synthèse continue, la transcription par l'ARN Pol III est réprimée. Cette répression fait intervenir les protéines de la famille *Wsc* et la PKC, ainsi que d'autres éléments encore non identifiés.

### **1.3.2.4 Régulations spécifiques de la transcription par l'ARN Pol III chez les mammifères**

Chez les organismes unicellulaires, l'altération de la transcription par l'ARN Pol III se répercute rapidement en termes de survie. Chez les organismes pluricellulaires, les effets sont plus complexes et dépendent des tissus cellulaires considérés.

Certains mécanismes qui régulent la transcription par l'ARN Pol III n'existent que chez les organismes pluricellulaires. Un de ces mécanismes propres aux métazoaires est par exemple le processus cancéreux où la dérégulation de la prolifération cellulaire aboutit en l'immortalisation des cellules. Un autre caractère spécifique aux métazoaires est la différenciation cellulaire qui permet d'obtenir différents types de cellules spécialisées à partir de cellules pluripotentes. Nous allons voir qu'au cours de ces deux processus cellulaires la transcription par l'ARN Pol III est régulée.

#### **1.3.2.4.1 La transcription par l'ARN Pol III augmente dans les cellules cancéreuses et transformées**

Le cancer est un processus dans lequel des cellules normales ont subi des modifications d'ordre génétique qui évoluent en une série d'état malins jusqu'à arriver à un cancer invasif capable de se propager à travers le corps entier. Les cellules cancéreuses prolifèrent indépendamment des signaux régulant la croissance et échappent à l'apoptose (Hanahan et Weinberg, 2011 ; Hanahan et Weinberg, 2000). L'initiation et la progression des cancers sont clairement liées à la dérégulation de gènes impliqués dans la prolifération et/ou l'apoptose. Les gènes associés au développement des cancers sont des oncogènes ou des suppresseurs de tumeur. Les oncogènes sont activés suite à une altération génétique conduisant à la surexpression du gène ou à la modification de la structure de la protéine dont l'activité est alors modifiée (pour revue, Croce et al., 2008). A l'inverse, les suppresseurs de tumeur ont un rôle de régulateur fonctionnel dans la cellule, et c'est la perte de leur fonction qui résulte en un dysfonctionnement cellulaire associé à un cancer (pour revue, Sherr, 2004).

Nous verrons comment la transcription par l'ARN Pol III est dérégulée dans des cancers ou au cours de la transformation (passage des cellules normales à des cellules cancéreuses). Nous nous attarderons ensuite sur différents oncogènes et suppresseurs de tumeurs qui régulent la transcription par l'ARN Pol III.

#### **La transcription par l'ARN Pol III est dérégulée dans les cellules cancéreuses et transformées**

Dans diverses formes de cancers, la transcription par l'ARN Pol III est dérégulée. Une augmentation inhabituelle de la quantité de plusieurs transcrits par l'ARN Pol III est observée dans des cancers du sein, de l'ovaire, du cerveau, de l'œsophage, du poumon ou de la langue par rapport à des tissus sains (pour revues, Chen et al., 1997 ; White 2004 ; Marshall et White, 2008). De même, la transcription par l'ARN Pol III augmente dans des cellules transformées par des virus ou par des agents chimiques carcinogènes (Wang et al., 1995 ; Larminie et al., 1999 ; Gottesfeld et al., 1996 ; Felton-Edkins et al., 2002).

L'expression de TFIIC augmente dans certains cas de cancers tels que celui de l'ovaire ou du nasopharynx et dans des cellules transformées par quelques virus comme l'adénovirus, le virus simien SV40, ou le virus d'Ebstein-Barr (Marshall et White, 2008). De même, le facteur TFIIB est surexprimé dans certains autres cas de cancers, comme par exemple celui du colon ou du cerveau, et dans des cultures transformées avec le virus d'Epstein-Barr, le papovavirus ou le polyomavirus (Felton-Edkins et White, 2002 ; Marshall et White, 2008).

### Plusieurs oncogènes et suppresseurs de tumeur régulent la transcription par l'ARN Pol III

L'étude de quelques oncogènes et suppresseurs de tumeurs dans des processus de transformation a permis d'établir que la transcription par l'ARN Pol III est régulée par ces gènes et protéines associés aux cancers. A l'heure actuelle, le facteur TFIIB apparaît comme leur principale cible. Nous aborderons dans un premier temps le cas des protéines oncogéniques Ras et c-Myc qui conduisent à la stimulation de la transcription, puis dans un second temps le cas des suppresseurs de tumeur Rb (*retinoblastoma*), p53, PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) et BRCA1 (*Breast cancer susceptibility gene 1*) qui répriment la transcription par l'ARN Pol III. Nous verrons ensuite que les kinases JNK 1 et 2 (*c-Jun N-terminal kinases*), qui possèdent à la fois des propriétés oncogéniques et de suppresseurs de tumeur, régulent également la transcription des gènes de classe III.

La stimulation de la transcription par l'ARN Pol III par la voie **Ras** avait déjà été abordée au cours de la régulation du métabolisme du glucose. A l'origine, c'est l'étude du transactivateur X du virus de l'hépatite B qui a mis en évidence son effet stimulateur de la transcription par l'ARN Pol III via la voie Ras (Wang et al., 1997). La fonction de la protéine X reste assez méconnue même dans le cycle viral du virus de l'hépatite B (pour revue, Yen, 1996). Dans des lignées de cellules de *Drosophila melanogaster* qui expriment la protéine X, on peut observer une stimulation de l'expression des gènes transcrits par l'ARN Pol III. Dans ces cellules d'insecte et dans des cellules de rat également transformées par le gène X, le niveau de TBP est plus élevé que dans des cellules non transformées. L'analyse de transcriptions *in vitro* révèle que l'activité de TFIIB extrait de ces cellules transformées est plus forte que l'activité de TFIIB issues de cellules-contrôle, tandis que l'activité de TFIIC reste similaire dans des cellules transformées par le gène X ou non transformées. Ainsi, le transactivateur X est capable de stimuler la transcription par l'ARN Pol III, par la stimulation de l'expression de TBP qui est limitant dans les cellules (Wang et al., 1995). Plus tard, une seconde étude précise que la stimulation par la protéine X de l'expression de TBP et de la transcription par l'ARN Pol III passe nécessairement par la voie Ras : l'inactivation de la voie Ras (par mutation de la protéine ou par ajout d'un inhibiteur spécifique) empêche l'effet stimulateur précédemment observé de la protéine X dans des cellules transformées (Wang et al., 1997). Plusieurs éléments de la voie Ras font l'objet d'études pour le traitement des cancers (Downward, 2003). Parmi eux, les kinases ERK de la voie Ras sont anormalement actives dans environ 30 % des cancers humains ; l'activation d'ERK est généralement due à des mutations dans les gènes *RAS* (Downward, 2003). Ces kinases phosphorylent Brf1 et favorisent alors le recrutement de la Pol III sur TFIIB (Felton-Edkins et al., 2003b).

L'oncogène **c-Myc** (pour revue, Adhikari et Eilers, 2005) est également capable de stimuler la transcription par l'ARN Pol III. Des analyses d'immunoprécipitations de la chromatine suivies de séquençages (ChIP-Seq) montrent que c-Myc est présent sur une grande majorité des gènes transcrits et liés par l'ARN Pol III (Raha et al., 2010). La délétion par *knock-out* ou l'inhibition de

l'expression par ARNsi (pour *small interfering*) de c-Myc conduit à la diminution de la transcription par l'ARN Pol III tandis que l'expression de c-Myc exogène la stimule (Felton-Edkins et al., 2003a ; Gomez-Roman et al., 2003). La protéine c-Myc cible le facteur TFIIIB en s'associant avec les sous-unités Brf1 et TBP (Gomez-Roman et al., 2003). En outre, la protéine c-Myc recrute d'autres facteurs dont l'acétyltransférase Gcn5 qui stimulerait l'assemblage de complexes de transcription actifs (Kenneth et al., 2007).

La protéine **Rb** est un suppresseur de tumeur impliqué dans la répression de la prolifération cellulaire (pour article récent, Poznic, 2009). Cette protéine régule également la transcription par l'ARN Pol III. La protéine Rb se fixe au facteur TFIIIB et empêche ainsi le recrutement du complexe d'initiation sur les promoteurs des gènes de classe III (Larminie et al., 1997 ; Sutcliffe et al., 2000 ; Hirsch et al., 2004). Lors d'une stimulation mitogénique, la protéine Rb est phosphorylée et se dissocie de TFIIIB, permettant à la transcription d'être initiée au début de la phase S du cycle cellulaire (Scott et al., 2001). Dans le cas de la transformation virale par le virus SV40 ou le papovavirus, un antigène est exprimé et se fixe à Rb qui relâche alors TFIIIB, d'où une stimulation de la transcription par l'ARN Pol III (Larminie et al., 1999 ; Felton-Edkins et White, 2002).

Un autre suppresseur de tumeur impliqué dans la transcription par l'ARN Pol III est **p53**. Cette protéine protège la cellule des stimuli hyperprolifératifs inappropriés en instaurant un arrêt du cycle cellulaire ou en déclenchant l'apoptose ; son inactivation est donc cruciale dans l'oncogenèse (pour revue, Kruse et Gu, 2009). La protéine p53 réprime la transcription par l'ARN Pol III, à la fois *in vitro* (Chesnokov et al., 1996 ; Cairns et White, 1998) et *in vivo* (Cairns et White, 1998 ; Stein et al., 2002). Ici encore, TFIIIB est la cible du suppresseur de tumeur. En effet, p53 se lie à TBP et bloque le recrutement de TFIIIB aux promoteurs des gènes de classe III en empêchant l'interaction entre Brf1 et TFIIIC (Cairns et White, 1998 ; Crighton et al., 2003). De plus, l'activation de p53 est en partie médiée par la protéine **Arf** (*alternative reading frame*) : Arf séquestre Mdm2, une ligase responsable de la dégradation de p53, suite à un stimuli hyperprolifératif oncogénique (pour article récent, Weber et al., 1999). Et lorsque son expression est induite, Arf réprime la transcription par l'ARN Pol III d'ARNt (Morton et al., 2007).

Egalement suppresseur de tumeur, la protéine **PTEN** (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) régule la prolifération cellulaire en réprimant la cascade de signalisation en aval de Ras passant par les PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinases*) participant à la croissance cellulaire (Engelman et al., 2006). L'activation de PTEN réprime la transcription par l'ARN Pol III *via* les PI3K et la délétion du gène lève cette répression (Woiwode et al., 2008 ; Cabarcas et al., 2008). PTEN modifie l'état de phosphorylation des sous-unités Brf1, Brf2 et Bdp1 de TFIIIB et empêcherait ainsi leur association avec TBP, donc la formation du complexe TFIIIB (Woiwode et al., 2008 ; Cabarcas et al., 2008).

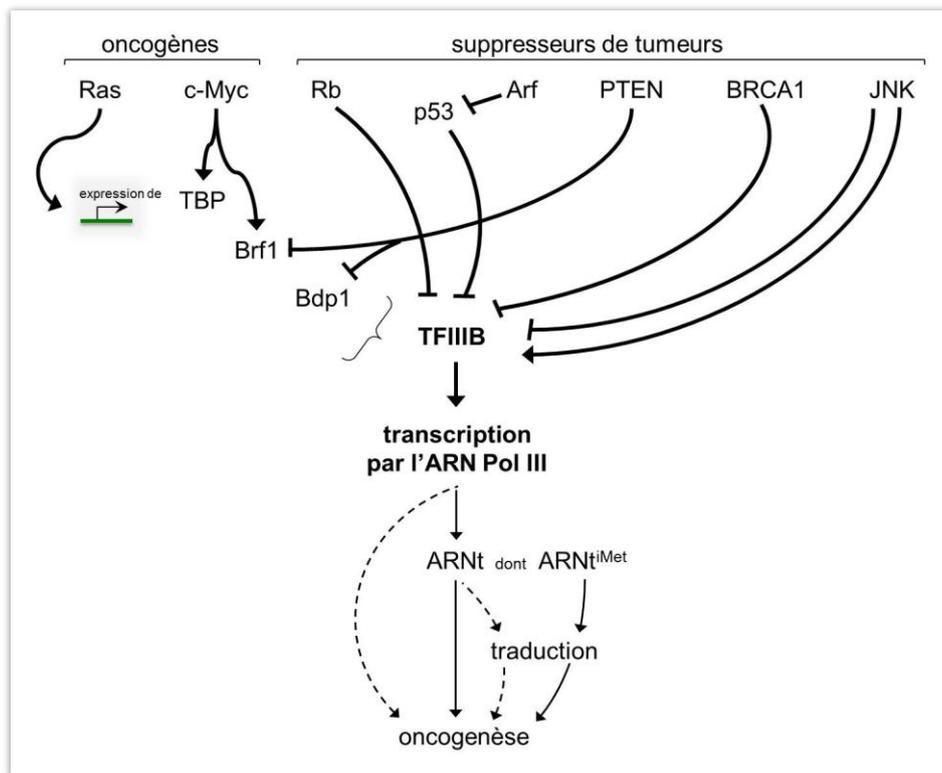
Le gène **BRCA1** (*breast cancer susceptibility gene 1*) code pour un suppresseur de tumeur impliqué dans la réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire, la surveillance de l'intégrité du génome et l'apoptose (Rosen et al., 2006). Dans des cellules HeLa, la surexpression du gène **BRCA1** inhibe la transcription de divers gènes de classe III (Veras et al., 2009). Toutefois, cette inhibition semble spécifique à certaines lignées cellulaires (Cabart et al., 2004 ; Veras et al., 2009). De plus, la surexpression supplémentaire de Brf1 ou de Brf2 contrecarre l'effet inhibiteur de BRCA1, suggérant ainsi que TFIIIB est encore la cible de la répression par BRCA1 (Veras et al., 2009).

Enfin, les **JNK** (*c-jun N-terminal kinases*), à la fois oncogéniques et suppresseurs de tumeur, régulent également la transcription par l'ARN Pol III. Les JNK sont activées en réponse à des stress, des stimuli pro-inflammatoires et des facteurs mitogéniques (Davis et al., 2000). Trois gènes (*JNK1*, *JNK2* et *JNK3*) encodent la dizaine d'isoformes de la protéine JNK. Les protéines JNK ont plusieurs fonctions : elles peuvent aussi bien déclencher l'apoptose que la prolifération cellulaire, selon le contexte spatio-temporel (type de cellule, stade de développement, environnement...) de leur activation (Bode et al., 2007). Par exemple, JNK1 stimule l'expression de TBP tandis que JNK2 la réprime (Zhong et al., 2007). A l'image du contrôle de la prolifération, cette opposition régule la transcription par l'ARN Pol III. Les protéines JNK régulent de manière coordonnée l'expression de Brf1, Bdp1 et TBP et alors que la transcription d'un gène d'ARNt est stimulée par l'activation de JNK1, celle de JNK2 l'inhibe (Zhong et Johnson, 2009). Cette régulation pourrait dépendre de la protéine c-Jun, une des cible des JNK, qui est présente sur une grande majorité des gènes transcrits et liés par l'ARN Pol III (Raha et al., 2010).

Bien que la transcription par l'ARN Pol III soit régulée par une variété d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs, on ne pouvait pas affirmer que cette régulation soit une cause ou une conséquence de l'établissement des cellules cancéreuses. Plusieurs expériences montrent aujourd'hui que la régulation de la transcription par l'ARN Pol III serait au moins une cause de l'oncogénèse.

La stimulation de la transcription des gènes de classe III par la surexpression induite de la sous-unité Brf1 ou Brf2 suffit à transformer des cellules de souris (Marshall et al., 2008 ; Lockwood et al., 2010). Par ailleurs, la transformation des cellules fibroblastiques de rat par c-Myc nécessite l'augmentation de l'expression de la sous-unité TBP et la stimulation de la transcription par l'ARN Pol III (Johnson et al., 2008). Chez l'homme, seule l'une des deux isoformes de l'ARN Pol III semble concernée par l'instauration de l'état tumoral. En effet, l'expression ectopique du paralogue RPC32 $\alpha$  associé à la forme  $\alpha$  de l'ARN Pol III, mais pas celle de RPC32 $\beta$ , stimulerait non seulement la transcription d'un partie des gènes de classe III, mais régule également l'expression de gènes impliqués dans l'établissement de cancers (Haurie et al., 2010).

De manière intéressante, indépendamment de la stimulation de l'expression de composants de la machinerie de la transcription par l'ARN Pol III, l'augmentation de la transcription d'un ARNt suffit à induire l'oncogénèse. L'expression d'un ARNt a été augmentée par l'ajout de multiples copies du gène correspondant. Ainsi, quelques ARNt dont en particulier l'ARNt<sup>iMet</sup>, mais pas l'ARNt<sup>Met</sup>, se sont révélés être oncogènes (Marshall et al., 2008). L'ARNt<sup>iMet</sup> est un ARNt original qui reconnaît le codon initiateur et est indispensable à l'intégration du premier acide aminé à la chaîne polypeptidique lors de la traduction. Il représente un facteur limitant pour la traduction (pour revue, Kolitz et Lorsch, 2010). Or la traduction joue elle-même un rôle important dans la transformation des cellules (pour revues, Bjornsti et Houghton, 2004 ; Mamane et al., 2004). L'étude de Marshall et al. (2008) relie finalement la surexpression de l'ARNt<sup>iMet</sup> à la stimulation de la traduction : l'augmentation de la transcription par l'ARN Pol III favoriserait au moins l'oncogénèse par l'augmentation de l'activité transcriptionnelle.



**Figure 14. La transcription par l'ARN Pol III est régulée par des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs et est impliquée dans l'oncogenèse**

#### 1.3.2.4.2 La transcription par l'ARN Pol III est régulée au cours de la différenciation cellulaire

Chez les métazoaires, toutes les cellules ne sont pas identiques. Pendant le développement de l'organisme et tout au long de sa vie, les cellules peuvent entrer dans un processus de différenciation cellulaire. Elles acquièrent des caractères physiologiques et métaboliques particuliers, suivant la spécialisation fonctionnelle de la cellule. C'est finalement grâce à la prolifération et grâce à la différenciation des cellules que l'organisme se construit et se développe. Une étude montre que la transcription par l'ARN Pol III a une incidence directe sur le développement du poisson-zèbre *Danio rerio*. Une mutation de la deuxième plus grande sous-unité de l'ARN Pol III empêche notamment le développement des organes digestifs de ce poisson (Yee et al., 2007). Ainsi, la transcription par l'ARN Pol III n'est pas seulement nécessaire à la simple prolifération des cellules, mais également au développement des organismes pluricellulaires. La coordination entre la transcription par l'ARN Pol III et la différenciation des cellules n'est pas encore élucidée mais quelques études nous aident à la compréhension de ce lien (pour revue Dumay-Odelot et al., 2010).

Remarquablement, les deux isoformes de l'ARN Pol III sont exprimées différemment suivant le type de cellules. Dans des cellules différenciées, seule la forme  $\beta$  qui est associée au paralogue RPC32 $\beta$  serait assemblée, tandis que l'ARN Pol III  $\alpha$ , associée à RPC32 $\alpha$ , semble présente dans les cellules embryonnaires et tend à disparaître au cours de la différenciation des cellules (Haurie et al., 2010). Remarquablement, les cellules n'exprimant plus l'ARN Pol III  $\beta$  ne croissent globalement plus (Haurie et al., 2010).

L'analyse des mécanismes régissant directement la différenciation est techniquement limitée par l'obtention de quantités suffisantes de cellules et d'extraits cellulaires. L'utilisation de cellules de carcinome embryonnaire permet de contourner cette limite, ces cellules présentant des propriétés similaires aux cellules souches qui se différencient (Jacob, 2002 ; Blum et Benvenisty, 2009). Lorsque des cellules de carcinome embryonnaire se différencient en cellules d'endoderme, la transcription par l'ARN Pol III diminue (White et al., 1989). Des expériences de transcription réalisées *in vitro* à partir d'extraits de ces cellules révèlent que l'activité de TFIIB est réduite (White et al., 1989). Plus précisément, la quantité des trois sous-unités Brf1, Bdp1 et TBP diminue (Alzuhri et al., 1998 ; Athineos et al., 2010). Par ailleurs, l'ajout de TFIIC1 (une fraction purifiée contenant TFIIC et Bdp1) issu de cellules encore non différenciées parvient à restaurer la transcription par l'ARN Pol III dans les cellules différenciées (Meissner et al., 2002). L'activité de Bdp1 serait donc altérée au cours de la différenciation.

La transcription par l'ARN Pol III peut également être régulée dans des cellules différenciées. Chez les mammifères adultes, des cardiomyocytes (cellules musculaires du cœur) ne se divisent plus mais continuent à croître. Au cours de cette croissance indépendante de la division cellulaire, appelée hypertrophie, la transcription par l'ARN Pol III est stimulée par l'augmentation de l'expression de Brf1, *via* c-Myc et ERK (Goodfellow et al., 2006).

En conclusion, la transcription par l'ARN Pol III serait non seulement régulée pendant le processus de différenciation, mais également dans certains types de cellules différenciées.

### 1.3.2.5 La structure et l'environnement physique des gènes de classe III influence leur transcription

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que la transcription par l'ARN Pol III peut être régulée par rapport à des signaux environnementaux ou intracellulaires. Nous verrons que d'autres mécanismes qui ne sont pas liés à des signaux extra- ou intracellulaires, comme l'état de la chromatine ou bien la transcription par l'ARN Pol II, influencent la régulation de la transcription par l'ARN Pol III.

La chromatine est composée d'euchromatine et d'hétérochromatine. L'euchromatine correspond généralement à de l'ADN décompacté, où les gènes sont fortement exprimés, tandis que l'hétérochromatine est à l'inverse très compacte, l'ADN étant surenroulé autour des protéines histones pour former les nucléosomes (Kornberg, 1974). Les nucléosomes structurent la chromatine et servent de barrière à la transcription : la compaction de l'ADN dans l'hétérochromatine maintient la répression transcriptionnelle sur les gènes en empêchant leur accès aux facteurs de transcription et aux ARN Pol (Strahl et Allis, 2000 ; Kornberg 2007). L'absence des nucléosomes dans les séquences promotrices des gènes favorise la transcription par l'ARN Pol II et par l'ARN Pol I (Han et Grunstein, 1988 ; Dammann et al., 1993).

Même si les gènes de classe III portent peu de nucléosomes (pour article récent Mavrich et al., 2008), en est-il de même pour la transcription par l'ARN Pol III ? Quelques expériences ont été menées à ce sujet. A partir d'ADN contenant le gène spécifiant l'ARNr 5S et de nucléosomes purifiés, une matrice chromatinienne a été reconstituée. Lorsque les nucléosomes sont positionnés *in vitro*

aux séquences promotrices, la transcription de l'ARNr 5S n'est pas possible (Morse, 1989). Toutefois, la répression transcriptionnelle des nucléosomes aux séquences promotrices n'est pas si évidente. En effet, *in vivo*, l'insertion de séquences de positionnement d'un nucléosome dans les séquences promotrices d'un gène d'ARNt<sup>Tyr</sup> n'affecte pas sa transcription (Morse et al., 1992). Aucun nucléosome n'est d'ailleurs positionné par la séquence-signal insérée dans le gène sauf lorsque le gène d'ARNt est inactivé par une mutation et n'est alors pas transcrit par la Pol III (Morse et al., 1992). D'autres études indiquent que la déplétion des nucléosomes n'influence pas l'occupation de la machinerie de transcription par l'ARN Pol III (Kim et al., 1988 ; Guffanti et al., 2006). Toutefois, les éléments de la machinerie de transcription pourraient être présents sur la chromatine et incapables de transcrire en présence de nucléosomes, comme il l'est suggéré pour le locus *ZOD1* transcrit par l'ARN Pol III (Guffanti et al., 2006).

D'autres protéines participent également à la structuration de la chromatine par les nucléosomes et constituent un autre point de régulation de la transcription. Les complexes FACT (*facilitates chromatin transcription*) et RSC (*remodels structure of chromatin*) modulent la transcription d'un gène d'ARNt<sup>Tyr</sup> (Mahapatra et al., 2011). Le complexe FACT, dont l'une des sous-unité est Nhp6, est un chaperon d'histones nécessaire à l'élongation de la transcription Pol II sur la chromatine (Orphanides et al., 1998). Le complexe RSC est quant à lui impliqué dans le remodelage de la chromatine pour l'activation de la transcription par l'ARN Pol II (Chaban et al., 2008). Ces deux complexes coopèrent pour insérer ou éjecter une forme d'histone, dans les nucléosomes de la région flanquante en 5' du gène de classe III, qui module directement sa transcription *in vitro* par l'ARN Pol III (Arimbasseri et al., 2008 ; Mahapatra et al., 2011). L'immunoprécipitation par le complexe FACT de la chromatine issue de cellules HeLa montre qu'il est présent sur les trois types de gènes transcrits par l'ARN Pol III (Birch et al., 2009). De son côté, le complexe RSC a été localisé sur la grande majorité des gènes transcrits par l'ARN Pol III par immunoprécipitation de la chromatine de levure suivie d'une analyse sur puce à ADN (Ng et al., 2002). L'inhibition de l'expression de RSC entraîne la diminution de la transcription des gènes de classe III accompagnée d'une augmentation du nombre des nucléosomes sur ces gènes (Soutourina et al., 2006 ; Parnell et al., 2008).

Parallèlement à l'organisation des nucléosomes, l'expression des gènes transcrits par l'ARN Pol II peut également dépendre de modifications telles que des méthylation. Les CpG (*cytosine-phosphate-guanine*) sont des dinucléotides consécutifs (C et G) dans la chaîne d'ADN et leur méthylation sont des marques épigénétiques qui corrént à l'inhibition de l'expression des gènes transcrits par l'ARN Pol II (Fan et al., 2008). Dans le cas du virus d'Epstein-Barr, la transcription par l'ARN Pol III des ARN EBER-1 et EBER-2 dépendent directement de la méthylation des CpG dans les gènes. La transcription *in vivo* des gènes viraux *EBER* dont les CpG ont été préalablement méthylés *in vitro* est réprimée (Banati et al., 2008). Plus globalement, l'analyse de l'occupation de l'ARN Pol III (déterminée par CHIP-Seq) et des transcrits obtenus (par RNA-Seq) indique qu'elle transcrit majoritairement des loci correspondant à de la « chromatine active » (Barski et al., 2010 ; Oler et al., 2010). Cet état chromatinien, caractéristique des gènes exprimés activement, correspond à des CpG non méthylés et à des modifications d'histones telles que des acétylations et des méthylation (Li et al., 2007 ; McStay et Grummt, 2008). Par ailleurs, dans une expérience où la phosphorylation de l'histone H28 est spécifiquement inhibée, la transcription par l'ARN Pol III diminue (Zhang et al.,

2011). L'accessibilité de l'ARN Pol III à ses sites de transcription peut donc être conditionnée par les modifications chimiques portées par la chromatine.

Finalement, la transcription par l'ARN Pol III se révèle être régulée par l'état chromatinien de manière similaire à la transcription par l'ARN Pol II (Li et al., 2007). La comparaison des deux types de transcription a poussé à l'analyse de l'occupation des deux ARN Pol (Barski et al., 2010). De manière surprenante, des immunoprécipitations de la chromatine suivies de séquençages (ChIP-Seq) révèlent que sur le génome humain, l'ARN Pol II se positionne sur ou près d'une grande partie des gènes transcrits et liés par l'ARN Pol III (Listerman et al., 2007 ; Oler et al., 2010 ; Raha et al., 2010). De plus, dans ces cellules, lors d'un traitement à forte dose d' $\alpha$ -amanitine bloquant spécifiquement l'élongation par l'ARN Pol II, la quantité de plusieurs ARN transcrits par l'ARN Pol III semble diminuer (Listerman et al., 2007 ; Raha et al., 2010). La transcription optimale par l'ARN Pol III *in vivo* dépendrait donc de la transcription, au moins de l'élongation, par l'ARN Pol II.

Par ailleurs, chez la levure, les deux gènes codant pour l'ARNr 35S, transcrit par l'ARN Pol I et l'ARNr 5S, transcrit par l'ARN Pol III, sont toujours séparés par des séquences IGS (*intergenic spacers*) qui servent de barrière transcriptionnelle : ces IGS sont occupées par l'ARN Pol II qui y est bloquée. Le départ de l'ARN Pol II des IGS conduit à un mauvais positionnement de l'ARN Pol III au gène de l'ARNr 5S et à la diminution de sa transcription *in vivo* (Mayan et Aragón, 2010). La transcription par l'ARN Pol III dépendrait donc également du positionnement de l'ARN Pol II et pas seulement de son activité transcriptionnelle.

Ainsi, la transcription par l'ARN Pol III est régulée de manière comparable à la transcription par l'ARN Pol II, par l'état chromatinien, à travers sa structure modulée par les nucléosomes ou par des modifications chimiques servant de marques épigénétiques. Mais l'activité transcriptionnelle de l'ARN Pol III serait également influencée par l'ARN Pol II, témoignant de la complexité de la régulation *in vivo* de la régulation de la transcription par l'ARN Pol III.

## 1.4 La répression de la transcription par l'ARN Pol III converge vers Maf1

Nous avons vu précédemment plusieurs cas où la transcription des gènes de classe III était réprimée. La répression de la transcription par l'ARN Pol III peut s'avérer nécessaire afin de permettre à la cellule de s'adapter de manière optimale aux conditions environnementales auxquelles elle est soumise. La répression de la transcription par l'ARN Pol III converge vers la protéine Maf1, premier répresseur spécifique de l'ARN Pol III identifié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le gène *MAF1* a initialement été identifié au cours d'un crible génétique chez *Saccharomyces cerevisiae* en tant que suppresseur de mutation d'un gène d'ARNt (Boguta et al., 1996). La mutation de *MAF1* conduit à une augmentation de la quantité d'ARNt et d'ARNr 5S dans des levures cultivées en milieu non fermentescible et ce phénotype est supprimé par des mutations dans le gène codant pour la grande sous-unité C160 de l'ARN Pol III (Boguta et al., 1996 ; Pluta et al., 2001). Le gène *MAF1* code pour une protéine de 395 acides aminés qui est conservée chez les eucaryotes, de la levure à l'homme en passant par les plantes (Pluta et al., 2001 ; Gajda et al., 2010). Maf1 est décrit en tant qu'effecteur final dans la répression de la transcription par l'ARN Pol III à travers plusieurs voies de signalisation dépendant des nutriments ou de stress.

### 1.4.1 Maf1 intègre les signaux de diverses voies de signalisation

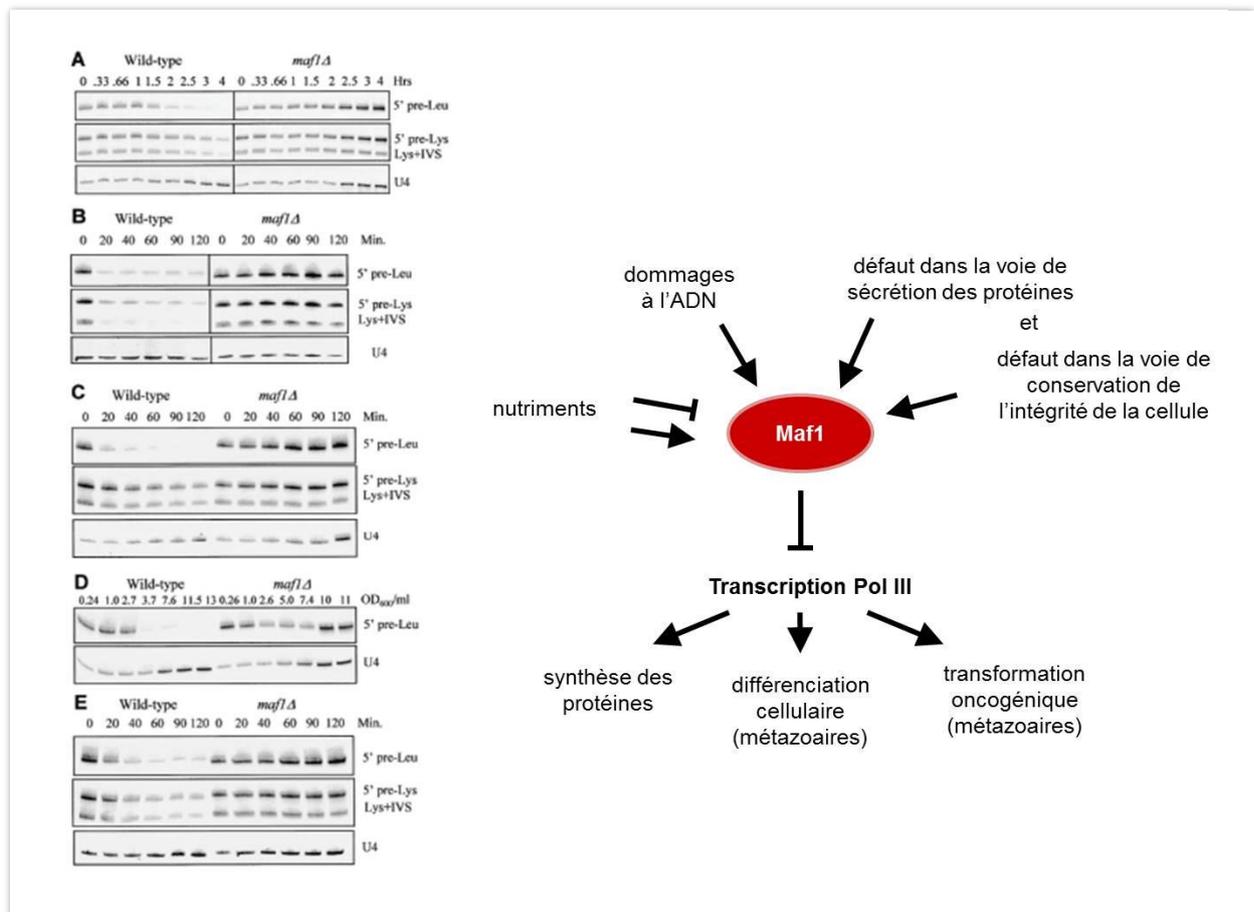
De nombreuses voies de signalisation régulent la croissance et la transcription par l'ARN Pol III comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents. Plusieurs de ces voies de signalisation convergent vers Maf1 lorsque la transcription par l'ARN Pol III est réprimée : stress génotoxiques, traitements affectant la voie de sécrétion des protéines, stress nutritionnels (Willis et al., 2004 ; Ciesla et Boguta, 2008 et figure 15).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les cellules ne disposant plus de la protéine Maf1 ne sont plus capables de réprimer la transcription des ARNt par l'ARN Pol III suite à plusieurs types de stress (Upadhyya et al., 2002). En effet, dans des mutants dont la voie de sécrétion des protéines est altérée, ou bien suite à un traitement au chlorpromazine, la délétion *maf1* $\Delta$  empêche la répression de la transcription par l'ARN Pol III (Upadhyya et al., 2002 ; Desai et al., 2005).

La répression de la transcription par l'ARN Pol III par Maf1 a par ailleurs été observée après un traitement par des agents génotoxiques comme le MMS ou l'HU activant des protéines des *checkpoints* (Upadhyya et al., 2002 ; Reina et al., 2006 ; Nguyen et al., 2010). Un stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène converge également vers Maf1 pour réprimer la transcription par l'ARN Pol III (Boisnard et al., 2009).

La voie Tor, sollicitée notamment lors de carences en nutriments mimées par un traitement à la rapamycine, met Maf1 en cause lors de la répression de la transcription par l'ARN Pol III. Maf1 a également été impliqué dans la répression transcriptionnelle au cours de l'entrée des cellules en phase stationnaire de croissance (Upadhyya et al., 2002 ; Wei et al., 2009 ; Kantidakis et al., 2010). La

répression transcriptionnelle est également médiée par Maf1 au cours de la régulation du métabolisme du carbone chez la levure : lors de la transition d'une source de carbone fermentescible, telle que le glucose, à une source de carbone non fermentescible, comme le glycérol, la transcription par l'ARN Pol III est réprimée, alors que la transition inverse l'active (Ciesla et al., 2007).



**Figure 15. Maf1 est un médiateur pour la répression de la transcription par l'ARN Pol III en réponse à plusieurs stress**

Les *northern-blot* sont réalisés à partir d'ARN extraits d'une souche sauvage (*wild-type*) ou d'une souche *maf1Δ*. Les ARNt détectés par les sondes sont indiqués sur le côté. Les conditions de régulation sont : (A) tunicamycine 2,5 µg/ml, (B) chlorpromazine 250 µM, (C) rapamycine, 0,2 µg/ml, (D) transition de la phase de croissance exponentielle à stationnaire et (E) méthylsulfonate de méthane 0,08 % (d'après Upadhyaya et al., 2002).

## 1.4.2 Maf1 est régulé par des phosphorylations et des déphosphorylations

L'activité de Maf1 est régulée par son état de phosphorylation. La protéine Maf1 porte une trentaine de sites potentiels de phosphorylation. Plusieurs de ces sites sont ciblés par les kinases PKA, Sch9 et CK2 et la phosphatase PP2A (Willis et Moir, 2006 ; Ciesla et Boguta, 2008 ; Wei et Zheng, 2010). Dans des conditions de croissance favorables, la protéine Maf1 est phosphorylée par les kinases et est alors majoritairement localisée dans le cytoplasme chez *S. cerevisiae* (Moir et al., 2006 ; Willis et Moir, 2007 ; Lee et al., 2009 ; Wei et al., 2009). En phase stationnaire ou en conditions de stress (stress nutritionnels, dommages à l'ADN), la protéine Maf1 est déphosphorylée et importée dans le noyau, où elle réprime la transcription par l'ARN Pol III (Oficjalska et al., 2006 ; Roberts et al., 2006).

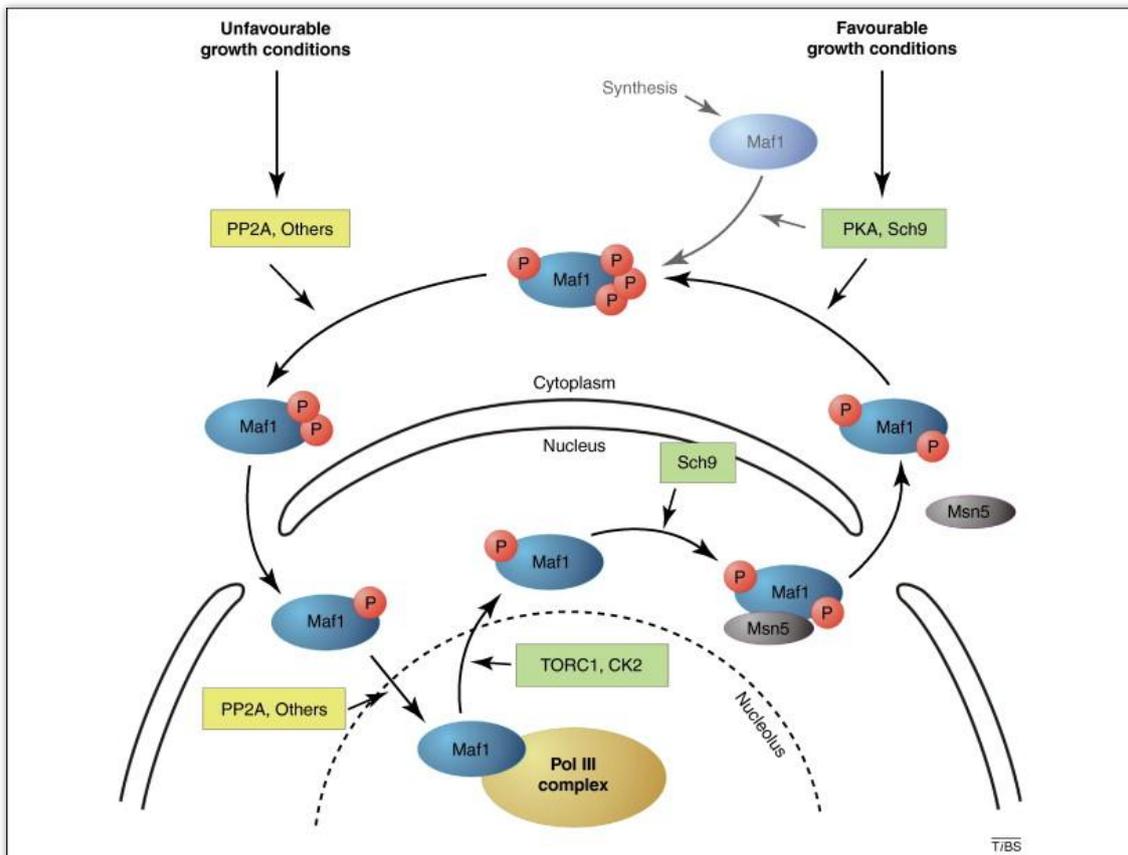
La PP2A (*protein phosphatase 2A*) est capable de déphosphoryler Maf1 (Oficjalska-Pham et al., 2006 ; Boissard et al., 2009). Cette phosphatase est un effecteur en aval de TORC1 dans la voie Tor. La déphosphorylation rapide de Maf1 est corrélée à sa localisation dans le noyau, à sa localisation sur les loci transcrits par l'ARN Pol III et à la répression de la transcription (Oficjalska-Pham et al., 2006 ; Roberts et al., 2006). Des mutations altérant l'activité catalytique de la PP2A entraînent des défauts de déphosphorylation de Maf1 et empêchent sa localisation nucléaire et son activité répressive sur la transcription par l'ARN Pol III (Oficjalska-Pham et al., 2006).

Le transport de Maf1 du noyau au cytoplasme est médié par Msn5, une exportine nucléaire. Lorsque le gène codant pour Msn5 est délété, Maf1 est constitutivement nucléaire, mais la répression par Maf1 de la transcription par l'ARN Pol III n'est pas constitutive et reste régulée (Moir et al., 2006 ; Towpik et al., 2008 ; Wei et al., 2009). La localisation nucléaire de Maf1 est une condition nécessaire mais pas suffisante à la répression de la transcription par l'ARN Pol III. Ce serait plus précisément la relocalisation de Maf1 au nucléole du noyau qui pourrait être essentielle à sa fonction de répresseur (Wei et al., 2009). Lorsque Maf1 est constitutivement nucléaire, la dérépression de la transcription reste également intacte lorsque les levures passent d'un milieu non fermentescible à un milieu fermentescible (Moir et al., 2006 ; Towpik et al., 2008 ; Wei et al., 2009). La localisation de Maf1 au cytoplasme n'est donc pas nécessaire à la dérépression de la transcription. L'état de phosphorylation global de Maf1 est par contre essentiel à sa fonction de régulateur de la transcription comme l'indiquent les analyses de plusieurs mutants exprimant des formes différemment phosphorylées de Maf1 (Towpik et al., 2008).

Plusieurs kinases phosphorylent la protéine Maf1. Dans la levure, la kinase PKA phosphoryle des résidus de Maf1 à proximité de séquences de localisation nucléaire (NLS pour *nuclear localisation signal*) ayant été identifiées et qui deviendraient alors inaccessibles, ce qui empêcherait Maf1 d'être transporté jusqu'au noyau (Lee et al., 2009 ; Moir et al., 2006). Cependant, lorsque la kinase PKA est activée constitutivement, par délétion de sa sous-unité régulatrice Bcy1 ou par une mutation particulière de *RAS2*, Maf1 n'est pas complètement phosphorylé et la répression de la transcription par l'ARN Pol III en réponse à un stress est partiellement bloquée (Moir et al., 2006). Ceci suggère que la phosphorylation de Maf1 est médiée par d'autres kinases. Parmi elles, on trouve la kinase Sch9, un effecteur de la voie Tor qui est phosphorylé par le complexe TORC1. L'expression d'une forme hyperactive de Sch9 conduit à une diminution de la répression de la transcription par

l'ARN Pol III (Wei et Zheng, 2009). Mais la répression de la transcription par l'ARN Pol III ne passe pas seulement par la kinase effectrice Sch9 : le complexe TORC1 lui-même peut être localisé sur des gènes de classe III et phosphoryle directement Maf1 *in vitro* (Wei et al., 2009 ; Michels et al., 2010 ; Kantidakis et al., 2010). Une autre kinase est également capable de phosphoryler Maf1 et de stimuler la transcription par l'ARN Pol III : la CK2 (Graczyk et al., 2011). Lorsque des levures sont transférées d'un milieu non fermentescible à un milieu fermentescible, Maf1 se dissocie des gènes transcrits par l'ARN Pol III pour lever la répression, et l'ajout d'un inhibiteur de la CK2 conduit à une forte diminution de cette dissociation et à l'absence de la dérégulation de la transcription des ARNt, ce qui suggère que l'activité de la CK2 est requise pour la dissociation du répresseur Maf1 de l'ARN Pol III (Graczyk et al., 2011). Les kinases et phosphatases actuellement connues pour réguler Maf1, le répresseur de la transcription par l'ARN Pol III sont répertoriées sur le schéma de la figure 16.

On note que cette régulation de la transcription par l'ARN Pol III par l'état de phosphorylation de Maf1 est conservée chez les mammifères, en particulier chez l'homme (Reina et al., 2006 ; Rollins et al., 2007 ; Jonhson et al., 2007 ; Goodfellow et al., 2008 ; Cabart et al., 2008 ; Michels et al., 2010).



**Figure 16. Le répresseur Maf1 est régulé à plusieurs niveaux**

La proportion de Maf1 présent dans le noyau et associé avec l'ARN Pol III dépend des signaux nutritionnels et de stress qui conduisent à la phosphorylation ou à la déphosphorylation de la protéine (d'après Boguta et Graczyk, 2011).

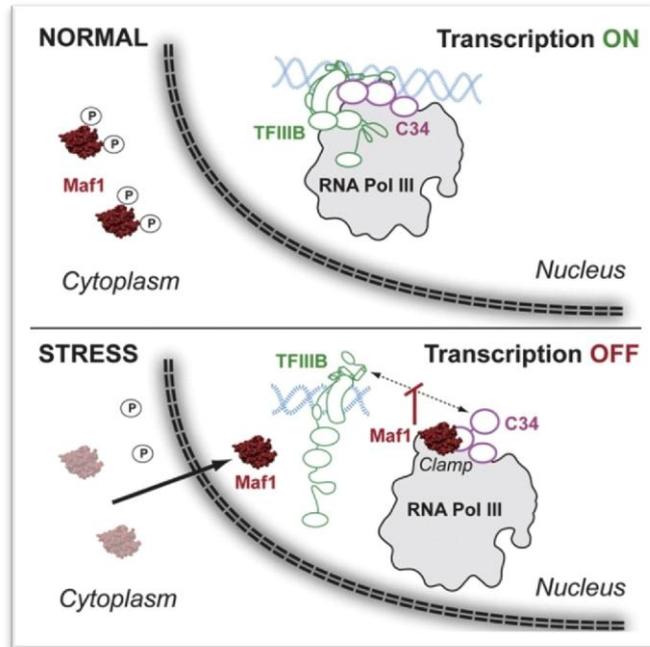
### 1.4.3 Interactions de Maf1 avec la machinerie de transcription par l'ARN Pol III

Quelques études réalisées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont permis d'éclairer le mécanisme d'action du répresseur Maf1 sur la transcription par l'ARN Pol III.

*In vivo*, Maf1 a été localisé sur les loci transcrits par la Pol III en conditions de répression de la transcription (Oficjalska-Pham et al., 2006 ; Roberts et al., 2006). *In vitro*, la protéine Maf1 recombinante est capable d'inhiber la transcription reconstituée à partir de fractions purifiées (Desai et al., 2005 ; Cabart et al., 2008). Toutefois, la présence de Maf1 n'affecte pas l'efficacité de la synthèse *in vitro* d'ARN dans des expériences d'extension d'amorce utilisant l'ARN Pol III, où la transcription est indépendante de l'étape d'initiation (Vanini et al., 2010). De même, une fois les facteurs de transcription assemblés dans le complexe de préinitiation et l'ARN Pol III engagée dans l'initiation ou l'élongation *in vitro*, Maf1 ne peut plus interagir avec les composants de la machinerie de transcription (Cabart et al., 2008). Par contre, lors d'une transcription *in vitro*, l'ajout préalable de la protéine Maf1 semble inhiber la réinitiation (Cabart et al., 2008). Le répresseur Maf1 n'inhiberait donc pas la transcription au cours de l'élongation mais bloquerait plutôt les étapes d'initiation et de réinitiation : Maf1 empêcherait la réinitiation facilitée.

Maf1 se lie *in vivo* et *in vitro* à l'ARN Pol III, notamment à sa sous-unité C160, ainsi qu'à la sous-unité Brf1 de TFIIIB (Desai et al., 2005 ; Pluta et al., 2001 ; Oficjalska-Pham et al., 2006 ; Cabart et al., 2008). Parallèlement, la répression médiée par Maf1 est associée à la diminution de l'occupation de Brf1 et de l'ARN Pol III sur les gènes transcrits par l'ARN Pol III (Oficjalska-Pham et al., 2006 ; Roberts et al., 2006). Cette interaction entre Maf1, l'ARN Pol III et TFIIIB est confirmée par l'analyse par cryomicroscopie électronique d'un complexe de Maf1 avec l'ARN Pol III : la liaison de Maf1 à l'ARN Pol III induit un réarrangement des sous-unités C82, C34 et C31 qui sont impliquées dans la reconnaissance de TFIIIB (Vanini et al., 2010). Maf1 empêcherait donc le recrutement de l'ARN Pol III au complexe de préinitiation (figure 17).

Hormis les séquences d'adressage au noyau (NLS) intervenant dans la localisation cellulaire de Maf1 (Moir et al., 2006 ; Lee et al., 2009), la séquence du gène ne donne aucune indication particulière sur la structure de la protéine. La séquence de Maf1 contient trois régions conservées appelées A, B et C et on distingue dans la protéine deux domaines correspondants d'une part à la région A et d'autre part aux régions B et C associées (Pluta et al., 2001 ; Gajda et al., 2010). L'interaction de ces deux domaines A et BC est nécessaire à la fonction de répresseur de Maf1 : des mutations altérant cette interaction conduisent à un défaut dans la déphosphorylation de Maf1 (Gajda et al., 2010). La structure cristallographique de Maf1 a été déterminée par rayons X mais n'a pas permis de mieux discerner les domaines fonctionnels de la protéine (Vanini et al., 2010).



**Figure 17. Schéma du mode d'action de Maf1 dans une cellule**

En conditions favorables de croissance, Maf1 serait phosphorylé et resterait au cytoplasme. En conditions défavorables de croissance, dépendant des nutriments ou à un stress, Maf1 est déphosphorylée et transféré au noyau, où il empêcherait le recrutement de l'ARN Pol III au facteur TFIIIB positionné sur le promoteur. (D'après Vannini et al., 2010)

## 1.5 Problématique

Au laboratoire, différents composants de la machinerie de base de la transcription par l'ARN Pol III ont relativement bien été décryptés et étudiés. La transcription des gènes d'ARNt a même été reconstituée *in vitro* chez la levure à partir de protéines TFIIB et TFIIC recombinantes et d'ARN Pol III hautement purifiée (Ducrot et al., 2006). Cependant, le niveau de transcription obtenu avec ce système recombinant est plus faible que celui obtenu avec des fractions protéiques partiellement purifiées : comme dans le cas de la transcription par l'ARN Pol II, le système entièrement recombinant correspondrait donc à un système de transcription basale. Quels éléments permettent de retrouver le niveau de transcription *in vivo* ? Et pourquoi ce niveau transcriptionnel serait-il modulable ?

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à un régulateur inédit de la transcription par l'ARN Pol III chez notre modèle d'étude *Saccharomyces cerevisiae* : la protéine Sub1. Par des approches à la fois *in vitro* et *in vivo*, nous avons cherché à caractériser les mécanismes moléculaires par lesquels Sub1 active le système de transcription par l'ARN Pol III : identification des éléments de la machinerie de transcription ciblés par Sub1, identification des gènes ciblés par Sub1, effet de l'inactivation de Sub1 à l'échelle de la transcription comme à l'échelle de la cellule de levure...

Nous nous sommes également intéressés aux différents partenaires de Sub1 hors de la machinerie de transcription par l'ARN Pol III. En effet, il serait intéressant de caractériser le rôle potentiel de Sub1 dans les mécanismes de régulation. En particulier, quel lien peut-il exister entre Sub1 et Maf1, la cible vers laquelle semble converger de nombreuses voies de signalisation lors de la répression de la transcription par l'ARN Pol III.

Un autre aspect de notre étude est l'identification des conditions dans lesquelles la protéine Sub1 serait importante. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la régulation de la transcription par l'ARN Pol III dans plusieurs conditions de croissance chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La transcription par l'ARN Pol III a non seulement un rôle considérable dans la synthèse des protéines, à travers sa régulation par les nutriments disponibles, par les stress que la cellule rencontre, mais également dans la transformation oncogénique et même le développement des organismes chez les métazoaires. De plus, la transcription par l'ARN Pol III influence elle-même d'autres mécanismes moléculaires tels que la réplication, la transcription par l'ARN Pol II. Il est donc d'un intérêt grandissant de pouvoir comprendre la régulation de l'activation de cette transcription sous tous ces différents aspects. L'étude de l'activateur Sub1 par rapport à un certain nombre de gènes impliqués dans diverses fonctions du métabolisme et en fonction de différents stress connus pour moduler la transcription par l'ARN Pol III fait donc partie de notre étude.

---

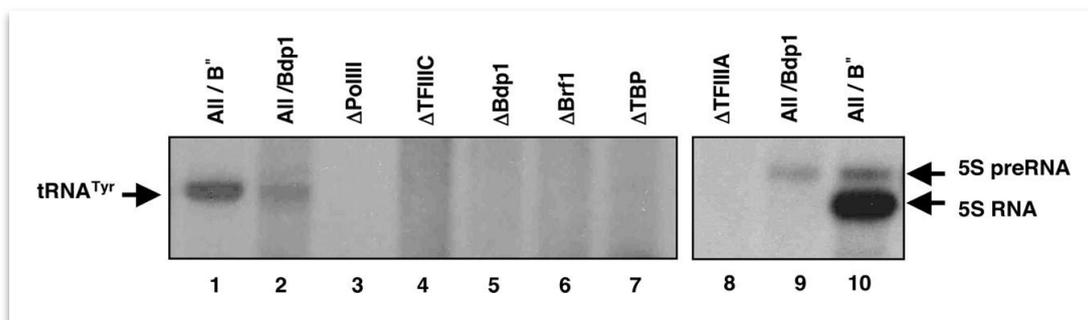
## Chapitre 2

# Etude d'un régulateur de la transcription par l'ARN Pol III : la protéine Sub1

---

### 2.1 La transcription par l'ARN Pol III *in vivo* est plus complexe que celle reconstituée *in vitro*

La transcription des gènes de classe III a été reconstituée avec succès *in vitro* à partir de protéines recombinantes et d'ARN Pol III hautement purifiée (Ducrot et al., 2006). Cependant, ce système ne conduit pas à un taux de transcription maximal, qui n'est obtenu que lorsque la fraction protéique de levure B'' partiellement purifiée (qui contient Bdp1) est utilisée à la place de la sous-unité Bdp1 recombinante (figure 18).



**Figure 18.** La transcription *in vitro* reconstituée avec des protéines recombinantes n'atteint pas le niveau de transcription obtenu avec la fraction B''

Les transcriptions *in vitro* des gènes de classe III *SUP4* (pour un ARNt<sup>Tyr</sup>, pistes 1 à 7) et *RDN5* (ARNr 5S, pistes 8 à 10) ont été réalisées dans un système reconstitué avec les facteurs recombinants TBP, Bdp1, Brf1, TFIIC, TFIIIA et l'ARN Pol III purifiée, ou en l'absence ( $\Delta$ ) d'un de ces composants dans le système reconstitué.

Dans les pistes 1 et 10, la fraction partiellement purifiée B'' a été utilisée à la place de Bdp1 recombinant dans le système reconstitué : le système de transcription reconstitué à partir de facteurs recombinants correspondrait à un système transcriptionnel de base. (D'après Ducrot et al., 2006)

Cette différence transcriptionnelle pourrait s'expliquer par l'absence de modifications ou des modifications incorrectes (phosphorylation, repliement, etc.) de certains polypeptides recombinants ou bien encore par la présence de facteurs additionnels dans la fraction B''. Ces facteurs additionnels pourraient réguler la transcription par l'ARN Pol III en étant eux-mêmes *in vivo* soumis à des contrôles. En d'autres termes, comme dans le cas de la transcription par l'ARN Pol II, le système de transcription par l'ARN Pol III reconstituée *in vitro* correspondrait à un système de transcription basale.

A partir de ce système reconstitué *in vitro*, nous avons recherché des protéines qui, comme la fraction B'', stimulent cette transcription par l'ARN Pol III basale. Parmi quelques candidats évoqués en introduction, une protéine qui co-purifie avec TFIIC et impliquée dans la terminaison de la transcription par l'ARN Pol III (Wang et Roeder, 1998) a été testée et s'est avérée capable de stimuler la transcription de notre système reconstitué *in vitro* : la protéine Sub1, ayant pour orthologue PC4.

Avant d'aborder les travaux qui nous ont permis de caractériser ce premier activateur de la transcription par l'ARN Pol III, nous nous attarderons sur les données disponibles sur Sub1 et PC4.

## 2.2 La protéine Sub1 et son orthologue PC4

*SUB1*, pour *suppressor of TFIIB mutations 1*, est un gène non essentiel dont l'orthologue chez l'homme est appelé *PC4*, pour *positive cofactor 4*. *SUB1* code pour une protéine de 32 kDa composée de 292 acides aminés (Knaus et al., 1996) tandis que *PC4* code pour une protéine deux fois plus petite, de 127 acides aminés (15 kDa).

Nous verrons que la première fonction décrite de Sub1/PC4 est celle de coactivateur de la transcription par l'ARN Pol II qui transcrit les ARNm. Mais Sub1 et PC4 possèdent également d'autres fonctions que nous présenterons ensuite (figure 19). Enfin, nous détaillerons la structure de Sub1/PC4 en particulier par rapport à son activité en tant que coactivateur. (Pour revues, Thomas et Chiang, 2006 ; Conesa and Acker, 2010).

### 2.2.1 Les fonctions de Sub1/PC4

#### 2.2.1.1 Sub1/PC4, régulateur de la transcription par l'ARN Pol II

Chez la levure, Sub1 a tout d'abord été identifié en tant que suppresseur de mutations thermosensibles de TFIIB, un facteur de la transcription par l'ARN Pol II (Knaus et al., 1996). Il a également été identifié sous le nom de Tsp1 (*Transcriptional Stimulatory Protein 1*) (Wu et al., 1999) comme coactivateur de la transcription de divers gènes par l'ARN Pol II. Les coactivateurs sont des intermédiaires entre la machinerie de transcription et des activateurs et régulent la transcription (Kaiser et Meisterernst, 1996). Sub1/PC4 est un intermédiaire entre des facteurs de la transcription

par l'ARN Pol II et plusieurs de ses activateurs (Ge et Roeder., 1994 ; Knaus et al., 1996 ; Henry et al., 1996).

Sub1/PC4 intervient à plusieurs étapes de la transcription par l'ARN Pol II mais sa fonction la mieux définie reste celle dans la préinitiation de la transcription. En effet, Sub1 et PC4 interagissent avec le facteur de transcription TFIIA, avec les protéines TAF (pour *TBP-associated factors*) du facteur TFIID, ainsi qu'avec le facteur TFIIB. Par ces interactions, Sub1/PC4 stimule l'assemblage *in vitro* du complexe de préinitiation de la transcription par l'ARN Pol II (Ge et Roeder, 1994 ; Kaiser et al., 1995 ; Lewis et al., 2005). Et à la fin de l'initiation, la protéine interagirait avec le facteur de transcription TFIIF pour faciliter l'échappement du promoteur (*promoter escape*), le moment pendant lequel la polymérase doit se détacher du promoteur pour poursuivre correctement la transcription (Fukuda et al., 2004).

Sub1/PC4 semble également intervenir au niveau de l'élongation de la transcription par l'ARN Pol II. Sub1 serait impliqué dans la phosphorylation du domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARN Pol II qui régule l'élongation de la transcription, en interagissant avec des kinases (Kin28, Bur1, Ctk1 et Srb10) et une phosphatase (Fcp1) ciblant ce CTD (Calvo et Manley, 2005 ; Garcia et al., 2010). De plus, Sub1 interagit génétiquement avec le facteur TFIIIS et la sous-unité Rpb9 de l'ARN Pol II, qui sont nécessaires à l'élongation de la transcription par l'ARN Pol II (Koyama et al., 2008).

Quelques données indiquent que Sub1/PC4 participe à la terminaison de la transcription et à la maturation des ARNm (Calvo et Manley, 2001 ; He et al., 2003). Le lien ces deux étapes est bien établi (pour revue, Buratowski, 2005) et renforcé par l'implication de Sub1/PC4 dans ces deux processus. Plus particulièrement, Sub1/PC4 y aurait deux fonctions antagonistes. D'un côté, Sub1 peut s'associer directement avec Rna15 (association conservée entre leurs orthologues respectifs PC4 et CstF-64) et Pta1, deux sous-unités des complexes de clivage et de polyadénylation des ARNm (pour revue, Shatkins et Manley, 2000). Sub1/PC4 inhiberait leurs fonctions dans la terminaison de la transcription et la maturation des ARNm : Sub1 serait alors un « antitermineur » de la transcription (Calvo et Manley, 2001). D'un autre côté, la surexpression de Sub1 permet de supprimer les défauts de maturation observés dans des souches où la protéine Pta1 est mutée, suggérant que Sub1 puisse également avoir un effet positif sur la terminaison de la transcription (He et al., 2003). Dans ces deux fonctions, Sub1 contribuerait à la terminaison correcte de la transcription par l'ARN Pol II.

L'ensemble de ces études indiquent que Sub1/PC4 semble être un activateur de la transcription par l'ARN Pol II. Mais d'autres travaux suggèrent que Sub1/PC4 serait également un répresseur de la transcription par l'ARN Pol II. En effet, la stimulation par PC4 de la transcription reconstituée *in vitro* dépend de la présence des TAF et de TFIIF : en leur absence, PC4 réprime fortement la transcription *in vitro* (Malik et al., 1998 ; Werten et al., 1998b). Dans ces conditions, le complexe de préinitiation est bien assemblé mais est incapable de transcrire (Malik et al., 1998). De plus, de fortes concentrations de PC4, même en présence de TFIIF et de TAF, conduisent à la répression de la transcription par l'ARN Pol II *in vitro* : PC4 entrerait en compétition avec les autres facteurs de transcription pour se lier à l'ADN, limitant ainsi la formation des complexes d'initiation (Werten et al., 1998b). De son côté, Sub1 réprime la transcription en inhibant la formation *in vitro* du complexe TBP-TFIIB sur les promoteurs (Knaus et al., 1996). Parallèlement à ces expériences menées *in vitro*, d'autres études confirment la fonction de répresseur de Sub1/PC4 *in vivo*. Par exemple, Sub1 a été caractérisé en tant que répresseur de l'expression de *IMD2*, un gène qui confère une résistance au mycophénolate (un inhibiteur de l'élongation de la transcription par l'ARN Pol II) (Koyama et al., 2008). Par ailleurs, des expériences réalisées dans des cellules HeLa montre que PC4 est une protéine chromatinienne qui pourrait interférer avec l'organisation de la structure de la chromatine : en

l'absence de PC4, la chromatine semble décompactée, en corrélation avec l'activation d'une centaine de gènes et à la répression d'une cinquantaine d'autres gènes (Das et al., 2006). Sub1/PC4 posséderait donc une double fonction d'activateur et de répresseur de la transcription par l'ARN Pol II.

### 2.2.1.2 Sub1/PC4 intervient dans d'autres mécanismes moléculaires et cellulaires

Bien que les gènes ciblés par le régulateur Sub1/PC4 ne soient pas tous identifiés, quelques études relient Sub1/PC4 à des mécanismes moléculaires et cellulaires autres que la transcription par l'ARN Pol II.

Par exemple, Sub1 participe à l'osmoréponse, la réponse transcriptionnelle au choc osmotique conduisant à l'adaptation et à la survie de la cellule. Lors d'un choc osmotique, la cascade HOG (*High-Osmolarity Glycerol*) est activée principalement *via* la MAPK Hog1 (p38 chez les mammifères), mais pas seulement (pour revue, Hohmann et al., 2007). En effet, d'autres voies de signalisation parallèles à Hog1 complètent l'osmoréponse (Rep et al., 1999(b)). La protéine Sub1 est impliquée dans l'une de ces autres voies de signalisation : Sub1 active l'expression d'une partie des gènes de l'osmoréponse lors d'un choc osmotique, en favorisant l'assemblage ou la stabilité du complexe de pré-initiation sur les promoteurs des gènes (Rosonina et al., 2009).

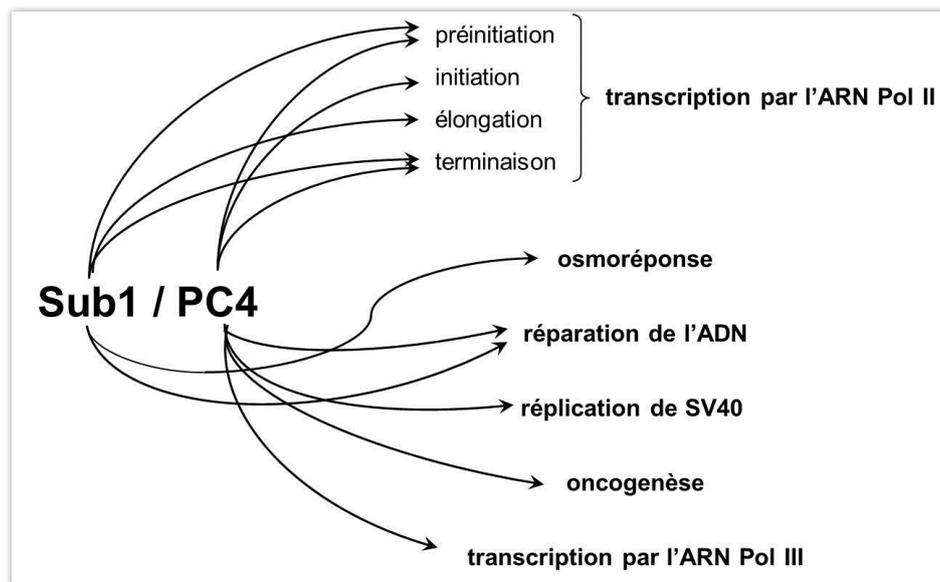
Ailleurs, Sub1/PC4 est requis dans la résistance au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et est impliqué dans la prévention des mutations spontanées et/ou induites par un stress oxydatif. Cette activité antimutatrice est liée au domaine de dimérisation et de liaison à l'ADN simple brin que possède Sub1/PC4 (Wang JY et al., 2004). Sub1 interagit avec Rad2 (et PC4 avec son orthologue XPG), une endonucléase du système NER (*Nucleotide Excision Repair*) de réparation d'ADN lésé (Wang et al., 2004). La protéine PC4 semble d'ailleurs s'accumuler transitoirement aux sites où l'ADN est endommagé suite à un stress oxydatif tel que l'exposition au HU, au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou aux ultra-violets (Mortuzewicz et al., 2008). Ces données suggèrent ainsi l'implication de Sub1/PC4 dans un mécanisme de réparation de l'ADN.

Sub1/PC4 pourrait également intervenir dans la réplication. PC4 peut former des complexes avec la protéine RPA (*replicative protein A* ; également appelée HSSB pour *human single-stranded binding protein*), qui est nécessaire au déroulement de l'ADN et à la réplication du virus SV40 (Pan et al., 1996). En s'associant à RPA sur de l'ADN simple brin, PC4 peut ou bien altérer la réplication du génome viral, ou bien la stimuler si elle n'est présente qu'en faible quantité par rapport à RPA (Pan et al., 1996).

PC4 serait également impliqué dans l'oncogenèse. En effet, PC4 est capable d'inhiber la transformation médiée par Ras de cellules humaines, comme un suppresseur de tumeur (Kannan et al., 1999). Par ailleurs, PC4 interagit avec le suppresseur de tumeur p53 et en stimule la fonction d'activateur transcriptionnel (Banerjee et al., 2004).

Enfin, la protéine PC4 semblait également impliquée dans la transcription par l'ARN Pol III. D'abord, il a été observé que PC4 co-purifie avec le facteur TFIIC (Wang et al., 1998). Ensuite, des expériences montrent que PC4 peut stimuler la transcription *in vitro* par l'ARN polymérase III du gène viral VA1 (Wang et al., 1998 ; Mertens et Roeder., 2008). Les expériences réalisées révèlent que PC4 ne stimule pas l'initiation mais plutôt la réinitiation (Wang et al., 1998). De plus, PC4 semble également impliqué dans la terminaison de la transcription par l'ARN Pol III : dans un système

reconstitué *in vitro*, la transcription du gène VA1 ne s'arrête précisément au site de terminaison qu'en présence de PC4 (Wang et al., 1998). Enfin, tout récemment, une étude montre que la protéine Sub1 est présente non seulement sur des gènes de classe II mais également de manière inattendue sur des gènes de classe III (Rosonina et al., 2009). Parmi les différentes fonctions de la protéine Sub1/PC4, ce sont ces dernières données concernant PC4 et la transcription par l'ARN Pol III qui nous ont particulièrement intéressés.



**Figure 19. Sub1 et PC4 sont impliqués dans plusieurs mécanismes cellulaires**

On remarque que toutes ces fonctions de Sub1 et de PC4 ont lieu à proximité de l'ADN. Dans les paragraphes suivants, nous verrons que les informations disponibles sur la structure de Sub1 et de PC4 confirment leur capacité à interagir avec l'ADN.

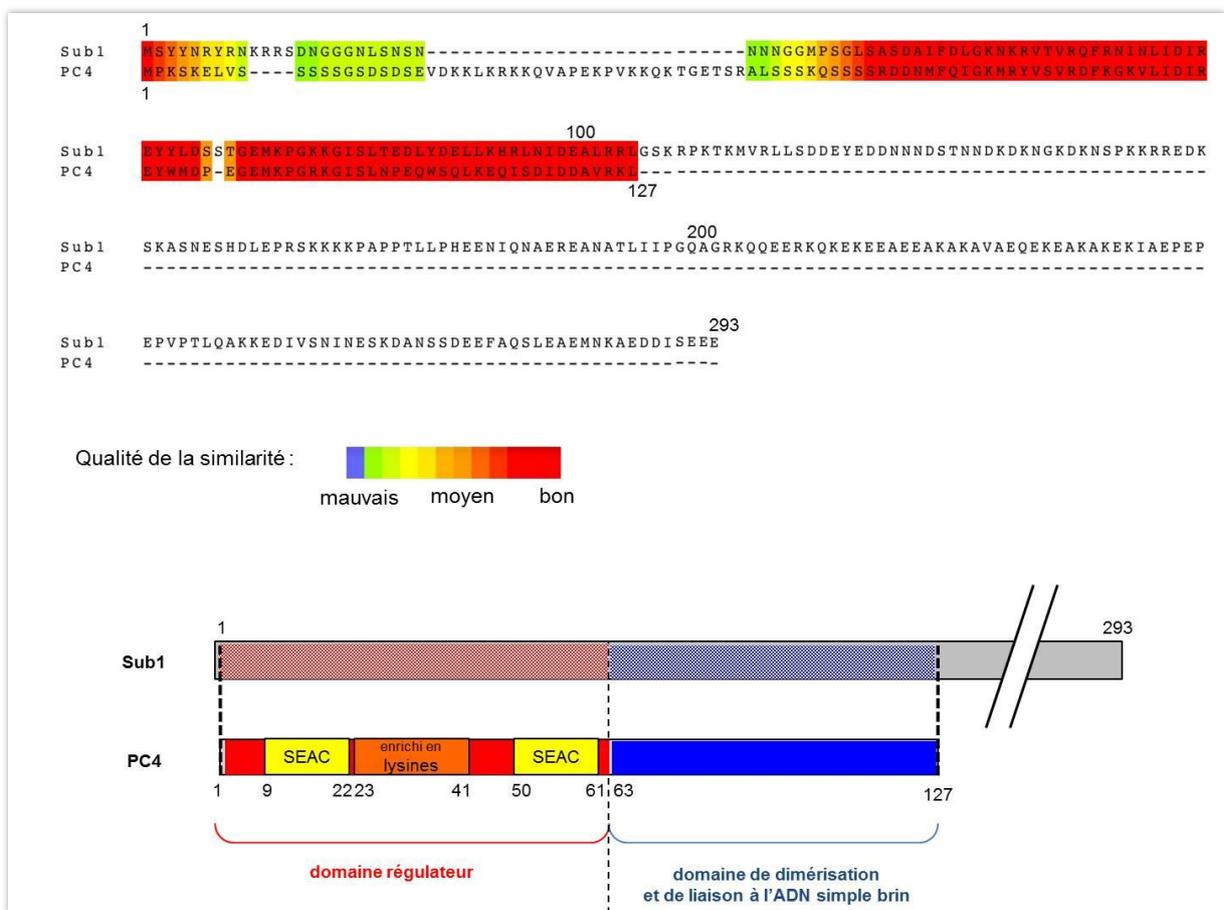
### 2.2.1.3 Structure de Sub1/PC4

La séquence entière de PC4 peut être contenue dans la séquence de Sub1 (figure 20). La partie C-terminale de Sub1 non commune avec PC4 n'a pour le moment pas de fonction connue. A ce jour, les données dont nous disposons concernent surtout la structure de PC4.

Du côté C-terminal de PC4 se trouvent un motif de liaison à l'ADN simple brin ainsi qu'un domaine de dimérisation nécessaire à sa capacité de liaison à l'ADN simple brin (Kretschmar et al., 1994 ; Brandsen et al., 1997 ; Werten et al., 1998 ; Werten et Moras, 2006). Ce domaine C-terminal est responsable de l'interaction de PC4 avec les activateurs (Jonkers et al., 2006b ; Ge et Roeder, 1994), et de la fonction de répresseur de PC4 (Wertens et al., 1998b).

Dans la partie homologue aux deux protéines, la partie N-terminale est flexible et déstructurée (Jonkers et al., 2006b). Cette région est riche en sérines et résidus acides et est plus petite dans Sub1 (5 sérines dans 17 résidus) que dans PC4 (deux domaines avec 9 sérines dans 16

résidus et 8 sérines dans 13 résidus) (Henry et al., 1996). Dans PC4, les deux domaines riches en sérines sont séparées par une région riche en lysines (Kaiser et al., 1995). La modification de certains acides aminés de cette partie N-terminale de PC4 régule la fonction de coactivateur de PC4 et sa capacité de liaison à l'ADN (Kretzschmar et al., 1994 ; Jonkers et al., 2006a et b). Par exemple, l'activité de coactivateur est inhibée par la phosphorylation de sérines, notamment par les kinases CK2 et PKC (Ge et al., 1994), par des facteurs du Médiateur (complexe d'activation de la transcription par l'ARN Pol II) (Gu et al., 1999), ou par les facteurs TFIID et TFIH (Malik et al., 1998). La protéine PC4 peut également être acétylée au niveau de deux lysines par p300, un autre coactivateur, et cette acétylation stimulerait la capacité de PC4 à se lier à l'ADN double brin (Kumar et al., 2001). Toutefois, cette capacité de PC4 à lier l'ADN double brin n'est corrélée à aucune fonction connue *in vivo*.



**Figure 20. Alignement des séquences de la protéine PC4 et Sub1**

En haut, alignement des séquences Sub1 (*Saccharomyces cerevisiae*) et de PC4 (humain réalisées avec les séquences disponibles sur PubMed et le programme T-Coffee). Les régions surlignées sont les régions similaires voire consensus (rouge).

En bas, représentation schématique des séquences protéiques de Sub1 et PC4, d'après Thomas et Chiang, 2006. Dans PC4, le domaine régulateur (rouge) comprend des régions riches en sérines et résidus acides (jaune ; domaines SEAC pour *serine enriched acidic*), séparées par une région riche en lysines (orange). Le domaine de dimérisation et de liaison à l'ADN simple brin est coloré en bleu.

## 2.3 Sub1 est un régulateur de la transcription par l'ARN pol III

Notre laboratoire s'intéresse à la machinerie de transcription de l'ARN Pol III et à sa régulation. Comme le système de transcription que nous avons reconstitué *in vitro* n'est pas optimal, nous nous sommes demandés si un activateur pouvait stimuler cette transcription. Nous avons donc recherché des activateurs de la transcription par l'ARN Pol III dans la littérature. Parmi les quelques régulateurs répertoriés que nous avons présentés en introduction, nous nous sommes intéressés à Sub1, malgré le fait que PC4 ait été présenté comme un candidat au faible potentiel pour activer la transcription : « PC4 [is] present [...] only in trace amounts. Thus, [...] PC4 seem less likely than NF1 to participate in RNA polymerase III transcription in vivo » (Shramm et Hernandez, 2002). Nous avons alors testé l'effet de Sub1 sur notre système de transcription *in vitro* et observé que la protéine était capable de le stimuler. Nous avons alors entrepris la caractérisation de la protéine Sub1 en tant qu'activateur de la transcription par l'ARN Pol III, à travers plusieurs analyses à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Au cours de notre étude, nous avons détecté Sub1 sur les gènes de classe III *in vivo*. Nous avons également observé que Sub1 est capable de stimuler la transcription par l'ARN III reconstituée *in vitro* avec les facteurs TFIIIB et TFIIIC recombinants et avec l'ARN Pol III purifiée. Sub1 stimule deux étapes de la transcription : l'initiation et la réinitiation facilitée. Des expériences supplémentaires nous montrent que la protéine interagit directement avec TFIIIB et TFIIIC. Enfin, nous avons pu constater que la délétion de Sub1 dans la levure conduit à une diminution de la transcription par l'ARN Pol III en phase exponentielle de croissance.

Tous ces résultats font l'objet de l'article suivant :

**Tavenet et al., *Genome-wide location analysis reveals a role for Sub1 in RNA polymerase III transcription*, Proc Natl Acad Sci USA 2009.**

# Genome-wide location analysis reveals a role for Sub1 in RNA polymerase III transcription

Arounie Tavenet<sup>a</sup>, Audrey Suleau<sup>a,1</sup>, Géraldine Dubreuil<sup>a</sup>, Roberto Ferrari<sup>b,2</sup>, Cécile Ducrot<sup>a</sup>, Magali Michaut<sup>a</sup>, Jean-Christophe Aude<sup>a</sup>, Giorgio Dieci<sup>b</sup>, Olivier Lefebvre<sup>a</sup>, Christine Conesa<sup>a,3</sup>, and Joël Acker<sup>a,3</sup>

<sup>a</sup>Commissariat à l'Énergie Atomique, Institut de Biologie et de Technologies de Saclay, F-91101 Gif sur Yvette, France; and <sup>b</sup>Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli Studi di Parma, 43100 Parma, Italy

Edited by Robert G. Roeder, The Rockefeller University, New York, NY, and approved June 30, 2009 (received for review January 8, 2009)

**Human PC4 and the yeast ortholog Sub1 have multiple functions in RNA polymerase II transcription. Genome-wide mapping revealed that Sub1 is present on Pol III-transcribed genes. Sub1 was found to interact with components of the Pol III transcription system and to stimulate the initiation and reinitiation steps in a system reconstituted with all recombinant factors. Sub1 was required for optimal Pol III gene transcription in exponentially growing cells.**

Chip chip | PC4 | reinitiation | TFIIB

**P**C4 plays an important role in various cellular processes, including transcription, DNA repair, and replication (1–3). First identified as a RNA polymerase (Pol) II coactivator (2, 4), PC4 was shown to interact with activators and components of the Pol II basal transcription machinery (2, 5) and to enhance activator-dependent transcription, stimulating both initiation and promoter escape (6). However, in the absence of TFIIB and TFIID, PC4 represses basal transcription (5, 7). Sub1, the yeast ortholog of PC4, was characterized biochemically as a coactivator required for activated transcription in vitro (8) and genetically as a suppressor of certain TFIIB mutations (9). Further investigations extended the role of PC4/Sub1 to transcription elongation and mRNA processing. Sub1 was shown to regulate enzymes modifying the CTD of the largest subunit of Pol II and might therefore enhance elongation (10). Functional interactions between not only PC4/Sub1 and Cstf-64/Rna15 (11) but also Ptal and Sub1 (12) established additional connections between Sub1/PC4 and mRNA processing. PC4 has also been copurified with human TFIIC and was found to stimulate RNA Pol III transcription in vitro (13). Recently, PC4 was found to be associated with chromatin and to be important for chromatin organization, suggesting a more general role in transcription regulation (14).

Apart from its role in transcription, PC4 was implicated in other cellular processes, through its capacity to bind tightly to melted DNA and to single-stranded DNA (ssDNA, ref. 7). A direct interaction between PC4 and XPG, a subunit of the nucleotide excision factor, was correlated with the genetic interaction between their yeast counterparts, Sub1 and Rad2, suggesting a role for PC4/Sub1 in the repair of oxidative DNA damage (1). Furthermore, PC4 can form complexes with human HSSB protein on ssDNA and influences its replication function in vitro (3).

In this study, we identified the gene targets of Sub1 in exponentially growing yeast cells. Analysis of the genome-wide localization of Sub1 revealed its association to all of the genes transcribed by Pol III. We focused on the role of Sub1 in Pol III transcription. We present evidence that Sub1 is involved in Pol III transcription initiation and reinitiation processes in vitro and is required for optimal Pol III transcription in vivo.

## Results

**Genome-Wide Analysis of Sub1 Occupancy.** To define Sub1 gene targets in vivo, we performed a genome-wide analysis of Sub1 occupancy in exponentially growing cells. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed on epitope-tagged Sub1–3HA cross-linked chromatin and analyzed by hybridization to DNA microarrays harboring ORFs and intergenic regions similar to those

that we used in a previous work to analyze the genomic location of the Pol III transcription machinery (15). A defined number of loci were significantly enriched (991 loci with a  $P$  value  $<0.01$ ) under active growth conditions. Approximately one-fourth of the enriched loci were located within ORF; the others corresponded to intergenic regions and to genes encoding nontranslated RNAs. We noted that the *ACT1*, *PMA1*, *PYK1*, *ADHI*, and snoRNA genes previously identified as DNA targets of Sub1 by ChIP and PCR amplification (10, 16, 17) were indeed enriched in our data. The distribution of the loci corresponding to snoRNA genes shown in Fig. 1A extended the binding of Sub1 to all of the H/ACA box or C/D box snoRNA genes. To further identify Pol II gene targets of Sub1, the enriched loci with a  $P$  value  $<0.01$  were analyzed by using the GoTermFinder software. Three overrepresented GO categories ( $P$  value  $<10^{-5}$ ) were identified, indicating that Sub1 was preferentially bound to a subset of Pol II-transcribed genes encoding constituents of the cell wall (30 genes), the nucleosome (H2A, H2B, H3, and H4 histone genes) and the ribosome (10% of the enriched loci, corresponding to genes encoding constituents of the translational apparatus, including *TEF1*, *TEF2*, and 50 ribosomal protein (RP) genes). The distribution of the loci corresponding to RP genes is shown in Fig. 1A. Because RP and histone genes are among the most highly transcribed genes in exponentially growing cells, we determined the relationship between transcription rates and Sub1 occupancy. Interestingly, although Sub1 was also localized on very poorly transcribed ORFs, Sub1-associated Pol II genes globally tended to be highly transcribed [supporting information (SI) Fig. S1]. Remarkably, one-third of Sub1 enriched loci corresponded to Pol III-transcribed genes present on the arrays or to the intergenic regions and ORFs adjacent to these genes. As shown in Fig. 1A, the Loci Enriched by the Pol III Transcription Machinery (LEPTM, ref. 15), comprising tRNA genes and other genes transcribed by Pol III, like 5S RNA gene, *SNR6*, *RPR1*, and *SCR1* were significantly overrepresented among the most enriched DNA regions, suggesting the association of Sub1 to all Pol III-transcribed genes in conditions of active growth.

To confirm the results obtained by microarray hybridizations, we performed conventional ChIP assays on a set of selected Pol III-transcribed genes. Using real-time PCR on DNA fragments

Author contributions: G. Dieci, O.L., C.C., and J.A. designed research; A.T., A.S., G. Dubreuil, R.F., C.D., C.C., G. Dieci, and J.A. performed research; C.C. contributed new reagents/analytic tools; A.T., A.S., G. Dubreuil, R.F., C.D., M.M., J.-C.A., G. Dieci, C.C., and J.A. analyzed data; and C.C., G. Dieci, and J.A. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

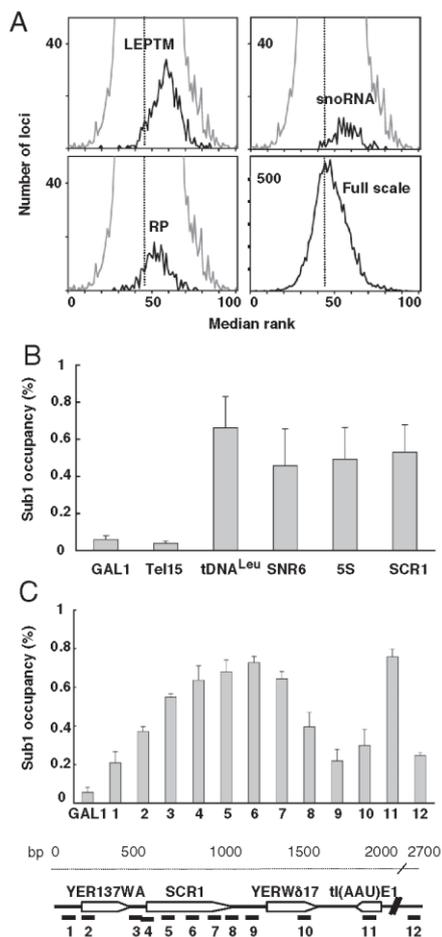
Freely available online through the PNAS open access option.

<sup>1</sup>Present address: Plateforme Diagnostique C. G. Harray, Hôpital Henri Mondor, 94000 Créteil, France.

<sup>2</sup>Present address: Department of Biological Chemistry, University of California, Los Angeles, CA 90095.

<sup>3</sup>To whom correspondence may be addressed. E-mail: joel.acker@cea.fr or christine.conesa@cea.fr.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0900162106/DCSupplemental](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0900162106/DCSupplemental).



**Fig. 1.** Sub1 is present on Pol I, Pol II and Pol III-transcribed genes. (A) Genome-wide binding of Sub1. The distribution of median ranks of binding ratios is represented as histograms. Loci corresponding to the Loci Enriched by the Pol III Transcription Machinery (LEPTM), RP genes and snoRNA genes are represented as indicated (black curves) within the global distribution of loci (gray curve). The full-scale shows the distribution of all of the loci. (B) Quantitative ChIP analysis on Pol III selected genes or all along the *SCR1* gene locus (C). The amounts of immunoprecipitated DNA from Tap-tagged Sub1 cells expressed as a value relative to that of the input are shown as histograms. The *GAL1* promoter or Tel15 DNA region were used as controls. Error bars represent the standard deviation between at least 3 independent replicates. A schematic organization of the *SCR1* locus and the positions of the 12 DNA fragments amplified by PCR are represented.

immunopurified from a Tap-tagged Sub1 strain, we quantified the binding of Sub1 to the tRNA<sup>Leu</sup>, 5S RNA, *SNR6* and *SCR1* genes that were significantly enriched (6- to 13-fold) compared with background signals measured on the *GAL1* gene promoter or on a telomeric region of chromosome XV (Fig. 1B). Note that the binding of PC4 to one tRNA gene (but not to the U6 gene) has been recently detected by ChIP experiments (18).

Previous works provided evidence that Sub1 was present at the promoter, the downstream region and across the entire length of several Pol II-transcribed genes (10, 17). The *SCR1* gene (522 bp) is the only Pol III-transcribed gene long enough to allow a spatial resolution by ChIP of the distribution of a binding protein. A ChIP experiment was thus performed analyzing 12 real-time PCR amplicons distributed along a 2.7-kb DNA region of chromosome V

that encompassed *SCR1* and the t(AAU)E1 (tRNA<sup>Leu</sup>) gene. As shown in Fig. 1C, Sub1 was detected significantly all along the *SCR1* gene and over the tRNA<sup>Leu</sup> gene, but not on the intergenic regions that separate these loci. A comparison of the enrichment profile of Sub1 across the *SCR1* gene with that of TFIIC, TFIIB and Pol III (19) suggested a colocalization of Sub1 with Pol III.

The DNA arrays used in our studies had a poor coverage of the rDNA gene locus. Nevertheless, we found a significant enrichment of all loci corresponding to that region, suggesting that Sub1 associates at many locations throughout the rDNA gene. A conventional ChIP experiment on the rDNA locus (Fig. S2) confirmed that Sub1 (but not TFIIC) bound all along the rDNA gene locus but preferentially to the Pol I-transcribed region, an enrichment profile similar to that of TFIIS, a protein involved in Pol II transcription that has been shown recently to play a role in Pol III transcription (19).

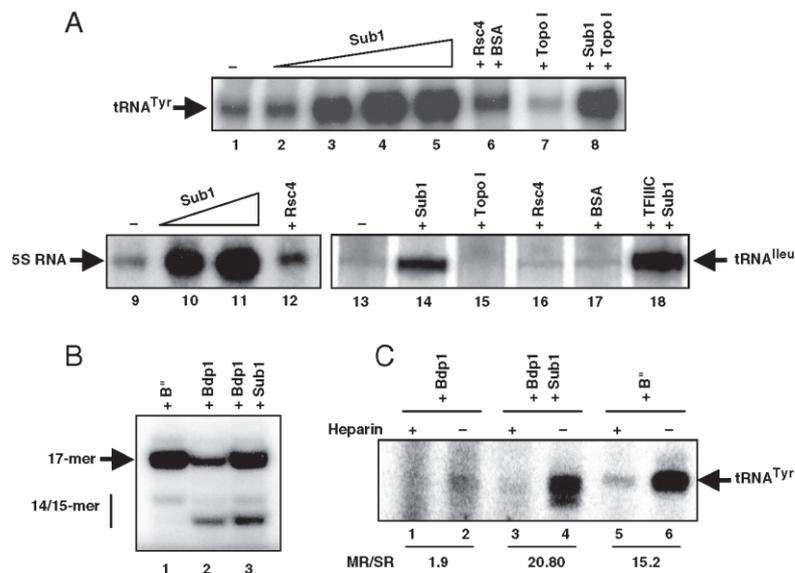
We wondered whether Sub1 genome-wide location could be modified under conditions where a global decrease of transcription was observed. To address this question, we performed ChIP on chip experiments from cells grown to stationary phase where a severe shutdown of transcription by Pol II has been described (20). The comparison of Sub1 binding in exponential or stationary phase grown cells showed that Sub1 occupancy went down substantially in stationary phase as illustrated in Fig. S3 for a subset of its Pol II targets or for LEPTM where the decrease in Sub1 binding was highly similar (Fig. S3B) to those published (21) for TFIIB or Pol III.

The binding of Sub1 to the transcribed sequences of genes that tend to be highly transcribed raised the possibility that part of the binding signals were because of nonspecific interactions of Sub1 with RNA transcripts (22). Although this hypothesis could not be ruled out, all *in vitro* data presented below strongly suggested that ChIP binding signals resulted from Sub1 association with DNA.

All together, our results suggested that Sub1 could be involved in all 3 transcription systems. In the following experiments, we focused on the role of Sub1 in Pol III transcription both *in vitro* and *in vivo*.

**Sub1 Stimulates a Reconstituted Pol III Transcription System.** The association of Sub1 to all Pol III-transcribed genes *in vivo* and the previous observation of a stimulatory effect of PC4 on a human Pol III transcription system *in vitro* (13) prompted us to test the effect of Sub1 on *in vitro* transcription. A transcription system reconstituted with all recombinant factors and highly purified Pol III directs a low level of RNA synthesis and needs to be supplemented with partially purified fractions like B'' (23) or TFIIE (24, 25) to restore strong transcription rates (26), suggesting the existence of positive auxiliary factors enhancing Pol III transcription. As shown in Fig. 2A, the presence of recombinant Sub1 (Fig. S4A) in a transcription system reconstituted with recombinant factors strongly stimulated (4- to 6-fold) *SUP4* tRNA<sup>Tyr</sup>, 5S RNA or tRNA<sup>Leu</sup> gene expression in contrast to any of the control proteins assayed (Rsc4, Topo I or BSA). Only specific Pol III transcription was stimulated because the presence of Sub1 did not change the nonspecific transcription activity of Pol III from DNA plasmid templates (Fig. S4C). Interestingly, Western blot analysis revealed the presence of Sub1 in the B'' fraction but not in the most purified TFIIE fractions (Fig. S4B and ref. 27) showing that Sub1 could not account for TFIIE activity.

A factor-independent *in vitro* transcription assay where Pol III autonomously initiates transcription at a 3'-end overhang of a linear DNA was then carried out, as described (28), to test whether Sub1 stimulation required the presence of transcription factors. Sub1 was able to stimulate Pol III transcription in this TFIIB/IIIC-independent assay but only when Pol III was in limiting amounts (Fig. S5), suggesting that Sub1 stimulation of Pol III transcription might take place, at least in part, through its ability to directly facilitate the productive interaction of Pol III



**Fig. 2.** Sub1 is a Pol III transcription activator in vitro. (A) Sub1 stimulates the minimal Pol III transcription system. In vitro transcription of the *SUP4-tDNA<sup>Tyr</sup>* gene, 5S RNA gene or *tDNA<sup>leu</sup>* gene containing a TATA-box was carried out in the presence of rTBP, rBrf1, rBdp1, rTFIIIC (except for lanes 13–17), rTFIIIA (lanes 9–12 only), purified Pol III, varying amounts of purified rSub1 (lanes 2–5: 8, 24, 80, 240 ng; lane 8: 240 ng; lanes 10–11: 40, 160 ng; lanes 14, 18: 200 ng), or 200 ng of control proteins Rsc4, a recombinant protein purified under the same conditions than rSub1, BSA or Topo I, a single-stranded DNA binding protein like Sub1 that may play a role in human Pol III transcription (13). (B) Sub1 stimulates transcription initiation. Synthesis of the 17-mer RNA from the *SUP4-tDNA<sup>Tyr</sup>* template was carried out by using rTFIIIC, rTBP, rBrf1 and purified Pol III in the presence of rBdp1, B<sup>+</sup> or rSub1 (100 ng). The positions of the 14/15-mer and 17-mer transcripts are indicated. (C) Sub1 enhances Pol III transcription reinitiation. Preinitiation complexes were assembled on the *SUP4-tDNA<sup>Tyr</sup>* gene for 20 min in the presence of rTFIIIC, rTBP, rBrf1 and rBdp1 (lanes 1–4), or B<sup>+</sup> (lanes 5–6). rSub1 (100 ng) was added in lanes 3–4. Purified Pol III (10 ng) was then added together with a mixture lacking CTP and the incubation was continued for 20 min. Transcription was then resumed by the addition of CTP, either in the presence (+) or in the absence (–) of heparin, and the incubation was continued for 5 min. The ratios of multiple round (MR) versus single round (SR) of transcription are indicated.

with DNA. This stimulation effect could not account, by itself, for the extent of stimulation by Sub1 in factor-dependent multiple round of transcription (Fig. 2A) where all the components were in saturating amounts.

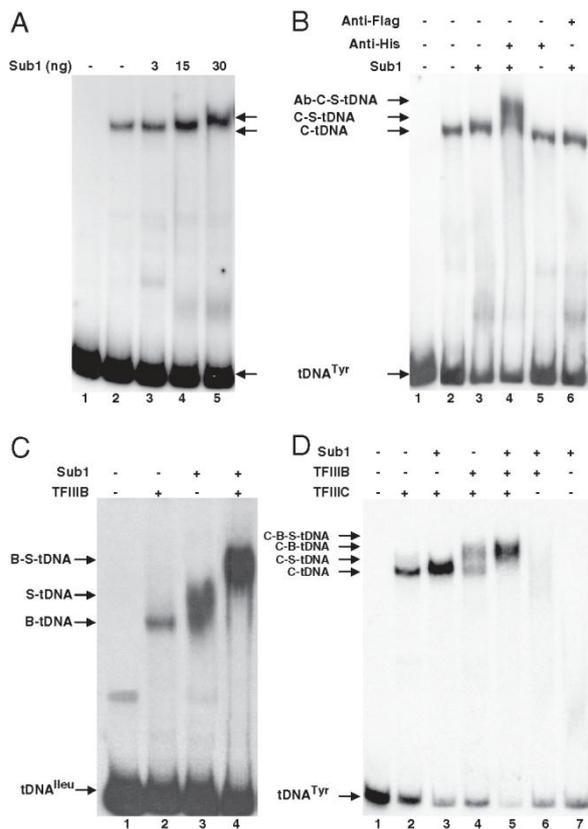
**Sub1 Stimulates Pol III Transcription Initiation in Vitro.** We examined the effect of Sub1 on transcription initiation in single round of transcription experiments using a *SUP4* tDNA template under conditions that yield a 17-mer RNA (Fig. 2B). As described, several transcription products were observed by using rTFIIIB. The 17- and 14-mer correspond to different start sites whereas the 15-mer results from the cleavage of the 17-mer product (29, 30). In the presence of B<sup>+</sup> fraction, only the 17-mer RNA was observed and the transcription level was stimulated up to 3 times. In the presence of rSub1, a similar stimulation of the transcription was observed but Sub1 had no effect on start site selection, indicating that Sub1 directly affected the initiation efficiency of Pol III transcription.

PC4 was found to enhance and extend the interactions of TFIIIC with tDNA (13, 18). We explored a possible role of Sub1 in the assembly of preinitiation complexes using gel shift assays. The addition of 3 or 15 ng of Sub1 was sufficient to promote the binding of a limiting amount of rTFIIIC (1–2 ng) to the *SUP4* tRNA<sup>Tyr</sup> gene, as evidenced by the clear increase in signal intensity (Fig. 3A). With larger amounts of Sub1, the mobility of the TFIIIC-DNA complexes decreased. Because the amounts of unbound DNA remained largely unchanged, a specific association between TFIIIC and at least one molecule of Sub1 was indicated. As shown in Fig. 3B, the addition of antibodies raised against the histidine epitope further decreased the mobility of the DNA complexes, showing the presence of histidine-tagged Sub1 in the supershifted TFIIIC-DNA complexes.

To test whether Sub1 could also influence the assembly of

rTFIIIB into preinitiation complexes, we took advantage of the *tRNA<sup>leu</sup>* (TAT) gene that can be transcribed in a TFIIIC-independent manner (31) and bound by rTFIIIB in gel shift assays (Fig. 3C). We also studied the recruitment of TFIIIB by TFIIIC to the *SUP4* tRNA<sup>Tyr</sup> gene that results in the formation of TFIIIB-TFIIIC-DNA complexes of slower electrophoretic mobility as shown in Fig. 3D. In both cases, the addition of Sub1 strongly stimulated the binding of TFIIIB resulting in the formation of a larger amount of slow-migrating complexes clearly distinct from the nonspecific protein-DNA complexes obtained with Sub1 alone. The stimulation of TFIIIB assembly on tDNA<sup>leu</sup> by Sub1 (Fig. 3C) was correlated with an at least 4-fold increase in the transcription levels observed in the presence of Sub1 using a minimal transcription system composed of rTFIIIB and Pol III (Fig. 2A, lanes 13–14). Furthermore, TFIIIC and Sub1 had additive stimulatory effects on transcription (Fig. 2A, lanes 14 and 18).

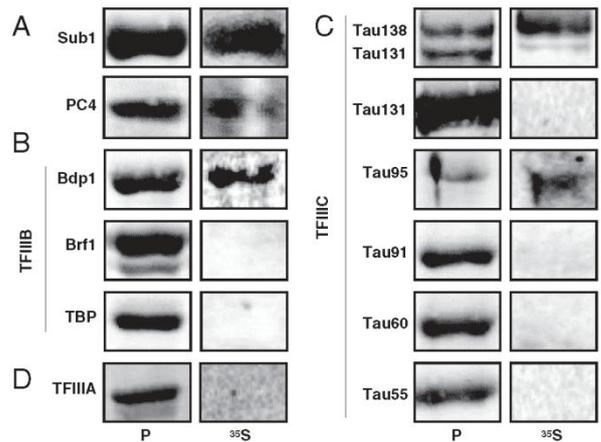
**Sub1 Stimulates Pol III Transcription Reinitiation in Vitro.** We next wondered whether the effects of Sub1 on Pol III transcription resulted only from the stimulation of preinitiation complexes assembly. To address this question, we carried out a time course analysis of *tRNA<sup>leu</sup>* synthesis (Fig. S4E) using our recombinant system in the presence or absence of Sub1. In both conditions, similar amounts of full-length transcripts could be visualized very rapidly (5 min), suggesting that the effects of Sub1 on transcription factors recruitment were not sufficient to explain the strong stimulation observed in multiple round of transcription (Fig. 2A). After 30 min of incubation, a strong accumulation of *tRNA<sup>leu</sup>* transcripts was observed only when Sub1 was present. Under these conditions, both de novo complex formation and reinitiation were combined. Because the high levels of Pol III transcription come mainly from reinitiation efficiency (32), we thus examined whether Sub1 could promote Pol III transcription reinitiation.



**Fig. 3.** Sub1 enhances the assembly of TFIIB-TFIIC-tDNA complexes. The positions of protein-tDNA complexes visualized by gel shift assays are indicated. Lane 1: control without protein. (A) Sub1 promotes the binding of TFIIC to tDNA. Limiting amounts of rTFIIC (C, 2 ng) were incubated in the presence of the indicated amounts of Sub1 (S) with the *SUP4*-tDNA<sup>Tyr</sup> probe. (B) Sub1 is recruited with TFIIB on tDNA. Endogenous yeast TFIIB was preincubated with the *SUP4*-tDNA<sup>Tyr</sup> probe for 10 min at 25 °C, alone or in the presence of 30 ng of Sub1 and then further incubated for 20 min at 25 °C with anti-histidine or anti-Flag monoclonal antibodies. (C) Sub1 stimulates the assembly of TFIIB on tDNA<sup>leu</sup>. rTFIIB (B, 10 ng) and Sub1 (100 ng) were incubated as indicated with the tDNA<sup>leu</sup> probe containing a TATA-box. (D) Sub1 helps TFIIC to recruit TFIIB on tDNA. rTFIIC (10 ng), rTFIIB (10 ng) or Sub1 (100 ng) were incubated as indicated with the *SUP4*-tDNA<sup>Tyr</sup> probe.

The transcription initiation frequency was determined for the *SUP4* tRNA<sup>Tyr</sup> gene (Fig. 2C) by comparing the output of multiple round versus single round transcription cycles performed with limiting amounts of Pol III, as described (33). The basal transcription system reconstituted with rTFIIC could support only 1.9 cycle of transcription in 5 min. In contrast, more than 20 transcription cycles were obtained within 5 min in the presence of Sub1 or B' fraction. Similar results were obtained with the tRNA<sup>leu</sup> gene (ratio of 1.2 and 19, Fig. S4D) showing that Sub1 played a critical role in the transcription reinitiation processes. Note that under limiting amounts of Pol III, part of the transcription stimulation could be due to a factor-independent effect of Sub1 on Pol III (Fig. S5).

**Sub1 Interacts with TFIIB and TFIIC Components.** Based on gel shift assays (Fig. 3), our results suggested that Sub1 helps TFIIB and TFIIC to assemble on tRNA genes, possibly through direct protein-protein interactions with basal factors, at least in a DNA-dependent manner. Far Western experiments were performed as described (34) using <sup>35</sup>S-labeled Sub1 as a probe (Fig. 4). As



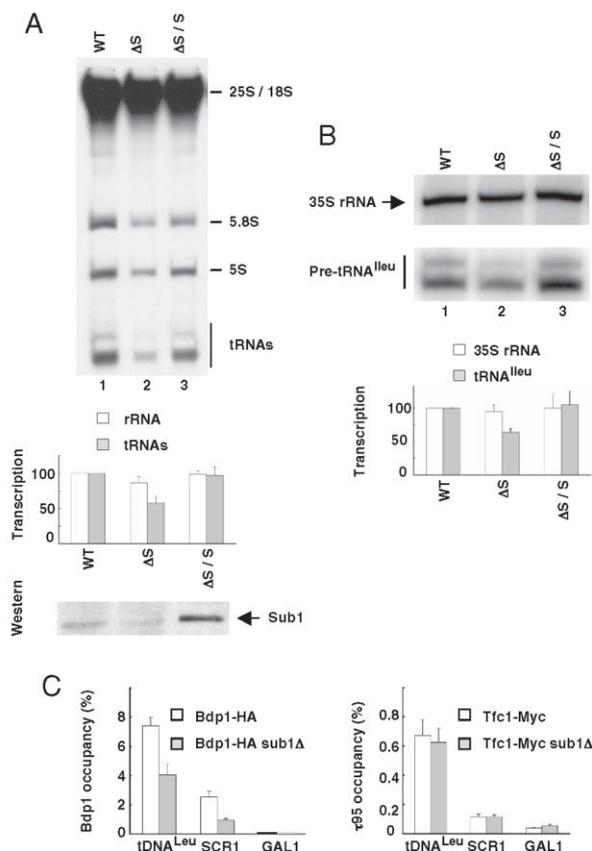
**Fig. 4.** Sub1 interacts with components of the Pol III transcription machinery. rSub1 or rPC4 (A), subunits of rTFIIB (B) or of rTFIIC (C), or rTFIIA (D) were subjected to SDS/PAGE, transferred onto a membrane, stained with Ponceau S (lanes P) and then probed with <sup>35</sup>S-labeled Sub1 (lanes <sup>35</sup>S). Labeled protein complexes were revealed by autoradiography.

expected, because PC4 forms tightly associated homodimers (35), we found that Sub1 interacted with itself and with PC4 (Fig. 4A). Sub1 was also found to interact with Bdp1, a component of TFIIB and with  $\tau$ 138 and  $\tau$ 95, 2 subunits of TFIIC, in good agreement with the coimmunoprecipitation of PC4 with human TFIIC (13). No interaction was detected with TFIIA. According to these data, the shifts seen in EMSA experiments (Fig. 3) after the addition of Sub1 may likely reflect both the binding of Sub1 to DNA in addition to direct interactions with TFIIB and TFIIC.

**Sub1 Is Required for Optimal Pol III Transcription in Vivo.** Because Sub1 acts as an activator of Pol III transcription in vitro, we next investigated whether the presence of Sub1 was important for Pol III transcription in vivo. There was no difference in the cell growth rate of exponentially growing *sub1Δ* cells as compared with wild type strain (8). Consistently, we could not detect any significant difference between both strains in the steady state levels of Pol III transcripts in exponentially growing cells (Fig. S6B Right). However, we did observe that *sub1Δ* crude extracts were systematically less efficient than wild type extracts in Pol III transcription as exemplified in Fig. S6A for the *SUP4* tRNA<sup>Tyr</sup> gene ( $\approx$ 20% less RNA transcripts). The addition of Sub1 stimulated the transcription in both *sub1Δ* and wild type extracts. However, the 20% lower activity of the *sub1Δ* extracts was too modest for further analysis.

In good accordance with these results, pulse labeling experiments performed on exponentially growing cells revealed that Pol III transcription was decreased in vivo in the absence of Sub1. The level of tRNA gene transcription was  $\approx$ 40% lower in *sub1Δ* cells as compared with wild type whereas the level of Pol I transcription measured by the neosynthesis of 25S and 18S RNA was not significantly changed (Figs. 5A and S6B Left). The defect in Pol III transcription was due to the absence of Sub1, because wild type levels of Pol III transcription were restored when Sub1 was expressed in *sub1Δ* cells from a centromeric plasmid (Fig. 5A Bottom). Primer extension analysis was performed on total RNA prepared from *sub1Δ* cells (Fig. 5B). Once again, whereas the levels of 35S RNA neosynthesis were not significantly altered, a  $\approx$ 35% decrease of tRNA<sup>leu</sup> (TAT) neosynthesis was observed in *sub1Δ* cells and wild type transcription levels were restored in *sub1Δ* cells expressing Sub1 from a centromeric plasmid.

We next wondered whether the decrease in Pol III transcription in *sub1Δ* cells was correlated to a lower occupancy of Pol III-



**Fig. 5.** Sub1 is an activator of Pol III transcription in exponentially growing cells. (A) Pol III transcription is less efficient in *sub1* $\Delta$  strain. Three micrograms of total labeled RNA prepared from WT, *sub1* $\Delta$  ( $\Delta S$ ) or *sub1* $\Delta$ /pCM-*SUB1* cells (*sub1* $\Delta$  transformed with a centromeric plasmid harbouring *SUB1*,  $\Delta S/S$ ) were analyzed by electrophoresis and fluorography. (Top) The positions of labeled 25S, 18S and 5.8S RNA transcribed by Pol I, and of 5S RNA and tRNAs transcribed by Pol III are indicated. (Middle) Quantitation of Pol I (25S + 18S rRNA) and Pol III (tRNAs) labeled transcripts in  $\Delta S$  or  $\Delta S/S$  cells are represented as histograms and as a percentage of their transcription in WT cells. Error bars represent the standard deviation between three independent experiments. (Bottom) The amounts of Sub1 in crude extracts (5  $\mu$ g) were analyzed by Western blot analysis with antibodies directed to Sub1. (B) The neosynthesis of tRNA<sup>Leu</sup> is decreased in *sub1* $\Delta$  cells. (Upper) The amounts of neosynthesized 35S rRNA or pre-tRNA<sup>Leu</sup> were determined by primer extension analysis on 4  $\mu$ g of total RNA. (Lower) Quantitation of neosynthesized 35S rRNA or pre-tRNA<sup>Leu</sup> in *sub1* $\Delta$  or *sub1* $\Delta$ /pCM-*SUB1* cells is represented as histograms and as a percentage of their transcription in WT cells. Error bars represent the standard deviation between three independent experiments. (C) Less TFIIB factor is associated to its gene targets in *sub1* $\Delta$  cells. ChIP assays were performed on WT or *sub1* $\Delta$  cells by using antibodies against HA (for Bdp1-3HA) or Myc (for Tfc1-13Myc) epitope and analyzed by real-time PCR on selected genes. Error bars represent the standard deviation between at least three independent replicates.

transcribed genes by the transcription machinery. To address this question, cross-linked chromatin extracts were prepared from *sub1* $\Delta$  strains expressing  $\tau 95$ -13myc or Bdp1-3HA. ChIP experiments were performed by using antibodies directed to the epitopes and analyzed by real-time PCR on selected Pol III-transcribed genes. As shown Fig. 5C, whereas TFIIC binding was unchanged, less TFIIB was present on the *SCR1* or tRNA<sup>Leu</sup> genes when *SUB1* was deleted. In good agreement with our in vitro data, these results suggested that Sub1 may help TFIIC to efficiently recruit TFIIB on DNA.

## Discussion

In this work, we demonstrate that Sub1 is present on Pol III-transcribed genes. We find that Sub1 stimulates in vitro Pol III transcription at two discrete steps of the transcription cycle. Although Sub1 is not an essential protein in exponentially growing cells, we show that its absence in vivo correlates with a decrease in Pol III transcription efficiency and with lower levels of TFIIB associated with two of its target genes.

**Sub1 Stimulates Two Steps of the Pol III Transcription Cycle.** In this work, we provide biochemical evidence that Sub1 strongly stimulates in vitro transcription by Pol III, in agreement with the stimulation of human Pol III transcription by PC4 (13, 18). Using a transcription system reconstituted with all recombinant factors and highly purified Pol III, we showed that recombinant Sub1 stimulated both the initiation and reinitiation steps of transcription. Sub1 was determined to promote the binding of both TFIIB and TFIIC to their cognate sites, likely through direct TFIIB and TFIIC interactions, resulting in increased levels of Pol III transcription. However, the main effect of Sub1 was to relieve the Pol III reinitiation defect observed when using recombinant factors. Therefore, Sub1 can be considered as a Pol III reinitiation factor. Although its exact function in that transcription step remains to be determined, one may hypothesize that Sub1 could help Pol III to be directly transferred from the terminator to the start site of transcription as it has been proposed in the facilitated recycling pathway (36).

In all our in vitro assays, optimal stimulations required higher molar amounts of Sub1 relative to that of TFIIC, TFIIB or Pol III. Several characteristics of Sub1 might contribute to this phenomenon. First, incomplete or inappropriate modification of Sub1 residues because of its expression in insect cells might decrease its activity (for example, acetylation of PC4 has been shown to interfere with its DNA binding activity, ref. 37). Second, because Sub1 was found to bind both single- and double-stranded DNA (8), a substantial amount of the protein could be sequestered by the nonspecific DNA present in the reaction mixtures. Last, Sub1 might bind to DNA as a dimer or even multimerize along the DNA as suggested for PC4 (35), as a prerequisite for productive interaction with the components of the Pol III transcription machinery on DNA.

**Sub1 Is Required for Optimal Pol III Transcription in Exponentially Growing Cells.** Our data imply that Sub1 is a novel Pol III transcriptional activator in vivo. The modest but reproducible decreased efficiency of Pol III transcription in *sub1* $\Delta$  cells suggests that Sub1 is necessary to sustain wild type levels of Pol III transcription under normal growth conditions. The lower transcription efficiency was correlated to a reduced association of Bdp1, a TFIIB subunit, with Pol III-transcribed genes. These data are in good agreements with a direct role of Sub1 on transcription initiation in vivo through the efficient recruitment of TFIIB by TFIIC on DNA.

However, we could not detect any significant difference in the steady-state levels of Pol III transcripts in the absence of Sub1 (Fig. S6B). Consistently, *SUB1* is a nonessential gene and its deletion does not interfere with the cell growth rate in exponentially growing cells (1, 8). All these results suggest the existence of regulatory mechanisms that compensate for the decreased neosynthesis of Pol III transcripts caused by the absence of Sub1 to maintain a wild type pool of tRNA in the cell.

Our genome-wide occupancy studies suggest that Sub1 could play a more general role in transcription than anticipated. Our data demonstrated that Sub1 is not restricted to the Pol II transcription system, but is also involved in Pol III transcription. A function of Sub1 in Pol I transcription remains an open possibility but our preliminary in vivo pulse labeling and primer

extension analysis provided no evidence for such a role, at least in exponentially growing cells.

The role of Sub1 is also likely to be more complex than a straightforward activation function. Both PC4 and Sub1 were recently shown to play a negative role in Pol II transcription *in vivo*. Knocking down PC4 expression using siRNA altered the expression of less than 200 genes, most of them being up-regulated (14), whereas disruption of *SUB1* increased *IMD2* transcription (38) showing that PC4/Sub1 could also repress the expression of some genes under normal growth conditions. Like the NC2 cofactor (39) or Mot1 (40), Sub1 may thus play both a positive and a negative role in transcription.

Finally, previous studies suggested that Sub1 may have some physiological importance under suboptimal growth conditions. For instance, it has been reported that the expression of Sub1 mRNA rapidly increases after transfer of quiescent yeast cells in rich medium (20). It would be interesting to analyze the possible role of Sub1 in reactivating transcription during recovery from poor growth conditions that were found to repress transcription (nutrients or serum starvation, mitotic repression, secretory pathway defects, oxidative stress, DNA damages, chemical treatments with diverse drugs). Furthermore, Sub1 has been shown to be required for resistance to the oxidizing agents *tert*-butyl hydroperoxide or hydrogen peroxide (1, 41) suggesting a role of Sub1 in the stress response. Further investigations should be performed to characterize conditions where Sub1 is necessary for cellular growth and to determine whether and by which molecular mechanisms Pol III transcription is regulated by Sub1 in such conditions.

- Wang JY, Sarker AH, Cooper PK, Volkert MR (2004) The single-strand DNA binding activity of human PC4 prevents mutagenesis and killing by oxidative DNA damage. *Mol Cell Biol* 24:6084–6093.
- Ge H, Roeder RG (1994) Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes. *Cell* 78:513–523.
- Pan ZQ, Ge H, Amin AA, Hurwitz J (1996) Transcription-positive cofactor 4 forms complexes with HSSB (RPA) on single-stranded DNA and influences HSSB-dependent enzymatic synthesis of simian virus 40 DNA. *J Biol Chem* 271:22111–22116.
- Kretzschmar M, Kaiser K, Lottspeich F, Meisterernst M (1994) A novel mediator of class II gene transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators. *Cell* 78:525–534.
- Malik S, Guermah M, Roeder RG (1998) A dynamic model for PC4 coactivator function in RNA polymerase II transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2192–2197.
- Fukuda A, et al. (2004) Transcriptional coactivator PC4 stimulates promoter escape and facilitates transcriptional synergy by GAL4-VP16. *Mol Cell Biol* 24:6525–6535.
- Werten S, et al. (1998) Interaction of PC4 with melted DNA inhibits transcription. *EMBO J* 17:5103–5111.
- Henry NL, Bushnell DA, Kornberg RD (1996) A yeast transcriptional stimulatory protein similar to human PC4. *J Biol Chem* 271:21842–21847.
- Knaus R, Pollock R, Guarente L (1996) Yeast *SUB1* is a suppressor of TFIIB mutations and has homology to the human co-activator PC4. *EMBO J* 15:1933–1940.
- Calvo O, Manley JL (2005) The transcriptional coactivator PC4/Sub1 has multiple functions in RNA polymerase II transcription. *EMBO J* 24:1009–1020.
- Calvo O, Manley JL (2001) Evolutionarily conserved interaction between CstF-64 and PC4 links transcription, polyadenylation, and termination. *Mol Cell* 7:1013–1023.
- He X, et al. (2003) Functional interactions between the transcription and mRNA 3' end processing machineries mediated by Ssu72 and Sub1. *Genes Dev* 17:1030–1042.
- Wang Z, Roeder RG (1998) DNA topoisomerase I and PC4 can interact with human TFIIC to promote both accurate termination and transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Mol Cell* 1:749–757.
- Das C, et al. (2006) Transcriptional coactivator PC4, a chromatin-associated protein, induces chromatin condensation. *Mol Cell Biol* 26:8303–8315.
- Harismendy O, et al. (2003) Genome-wide location of yeast RNA polymerase III transcription machinery. *EMBO J* 22:4738–4747.
- Nedea E, et al. (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. *J Biol Chem* 278:33000–33010.
- Yang PK, et al. (2005) Cotranscriptional recruitment of the pseudouridylyltransferase Cbf5p and of the RNA binding protein Naf1p during H/ACA snoRNP assembly. *Mol Cell Biol* 25:3295–3304.
- Mertens C, Roeder RG (2008) Different functional modes of p300 in activation of RNA polymerase III transcription from chromatin templates. *Mol Cell Biol* 28:5764–5776.
- Ghavi-Helm Y, et al. (2008) Genome-wide location analysis reveals a role of TFIIS in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev* 22:1934–1947.
- Radonjic M, et al. (2005) Genome-wide analyses reveal RNA polymerase II located upstream of genes poised for rapid response upon *S. cerevisiae* stationary phase exit. *Mol Cell* 18:171–183.
- Oficjalska-Pham D, et al. (2006) General repression of RNA polymerase III transcription is triggered by protein phosphatase type 2A-mediated dephosphorylation of Maf1. *Mol Cell* 22:623–632.
- Abruzzi KC, Lacadie S, Rosbash M (2004) Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes. *EMBO J* 23:2620–2631.
- Kassavetis GA, et al. (1992) The role of the TATA-binding protein in the assembly and function of the multisubunit yeast RNA polymerase III transcription factor, TFIIB. *Cell* 71:1055–1064.
- Dieci G, et al. (1993) A novel RNA polymerase III transcription factor fraction that is not required for template commitment. *J Biol Chem* 268:11199–11207.
- Ruth J, et al. (1996) A suppressor of mutations in the class III transcription system encodes a component of yeast TFIIB. *EMBO J* 15:1941–1949.
- Ducrot C, et al. (2006) Reconstitution of the yeast RNA polymerase III transcription system with all recombinant factors. *J Biol Chem* 281:11685–11692.
- Dieci G, et al. (2009) Positive modulation of RNA polymerase III transcription by ribosomal proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 379:489–493.
- Ferrari R, Dieci G (2008) The transcription reinitiation properties of RNA polymerase III in the absence of transcription factors. *Cell Mol Biol Lett* 13:112–118.
- Andrau JC, Werner M (2001) B'' associated factor (s) involved in RNA polymerase III preinitiation complex formation and start-site selection. *Eur J Biochem* 268:5167–5175.
- Chedin S, et al. (1998) The yeast RNA polymerase III transcription machinery: A paradigm for eukaryotic gene activation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63:381–389.
- Dieci G, et al. (2000) TFIIC-independent *in vitro* transcription of yeast tRNA genes. *J Mol Biol* 299:601–613.
- Dieci G, Sentenac A (1996) Facilitated recycling pathway for RNA polymerase III. *Cell* 84:245–252.
- Ferrari R, Rivetti C, Acker J, Dieci G (2004) Distinct roles of transcription factors TFIIB and TFIIC in RNA polymerase III transcription reinitiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13442–13447.
- Chaussivert N, Conesa C, Shaaban S, Sentenac A (1995) Complex interactions between yeast TFIIB and TFIIC. *J Biol Chem* 270:15353–15358.
- Werten S, Moras D (2006) A global transcription cofactor bound to juxtaposed strands of unwound DNA. *Nat Struct Mol Biol* 13:181–182.
- Dieci G, Sentenac A (2003) Detours and shortcuts to transcription reinitiation. *Trends Biochem Sci* 28:202–209.
- Kumar BR, Swaminathan V, Banerjee S, Kundu TK (2001) p300-mediated acetylation of human transcriptional coactivator PC4 is inhibited by phosphorylation. *J Biol Chem* 276:16804–16809.
- Koyama H, et al. (2008) Transcriptional repression of the *IMD2* gene mediated by the transcriptional co-activator Sub1. *Genes Cells* 13:1113–1126.
- Willy PJ, Kobayashi R, Kadonaga JT (2000) A basal transcription factor that activates or represses transcription. *Science* 290:982–985.
- Dasgupta A, et al. (2002) Mot1 activates and represses transcription by direct, ATPase-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2666–2671.
- Begley TJ, Rosenbach AS, Ideker T, Samson LD (2002) Damage recovery pathways in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic phenotyping and interactome mapping. *Mol Cancer Res* 1:103–112.

## Materials and Methods

**Yeast Strains.** All strains used in this study are described in *SI Text* and *Table S1*.

**ChIP, Microarray Hybridization, and Data Analysis.** ChIP and PCR were performed as described (15). The sequences of the oligonucleotides used in this study are available upon request. For ChIP on chip experiments, DNA from wild type or 3HA-Sub1 strains were competitively hybridized to DNA microarrays harbouring 14,172 yeast ORF and intergenic regions (15, 21). Data from 3 independent experiments were compiled. Data analysis are described in *SI Text*. The complete raw dataset and analyzed data are available at [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) (GEO accession no. GSE11054) in *SI, Datasets S1 and S2*.

**In Vitro Transcription Assays.** Transcriptions were performed as described in Ducrot et al. (26) with 10 ng of rTFIIC, 20 ng of rTBP, 10 ng of rBrf1, 10 ng of rBdp1 or 0.5  $\mu$ g of partially purified B'' fraction, 100 ng of highly purified Pol III and 40 ng of rTFIIIA when 5S DNA template was used. Facilitated transcription reinitiation assays were performed as described (33). Specific transcripts were visualized with a Typhoon 9200 Imager (Amersham Biosciences). Quantitation was performed by using the Quantity one software (Bio-Rad). See also *SI Text*.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We are grateful to A. Sentenac for helpful discussions and for improving the manuscript and N. Caudy for technical assistance. We thank M. Teichmann (Institut Européen de Chimie et Biologie, Université Bordeaux, Bordeaux, France) for the generous gift of purified PC4 and the pet-PC4 expression plasmid, Franck Amiot, Peggy Maltere, Amélie Robert for providing the DNA chip (CEA, IRCM) and N. Alic for help in 17-mer assay. This work was funded by grant ANR-07-BLAN-0039–01 from the French National Research Agency and by grant 1078 from the Association pour la Recherche contre le Cancer. A.T. was supported by the International PhD Program of the Commissariat à l'Energie Atomique.

# Supporting Information

Tavenet et al. 10.1073/pnas.0900162106

## SI Text

**Oligonucleotides, Plasmids, and Yeast Strains.** The sequences of the oligonucleotides used in this study are available upon request. The coding sequence of *SUB1* was subcloned in the pScodon1 vector (Eurogentec) to give the pScodon-*SUB1* plasmid. The DNA encoding 6His-Sub1 was subcloned in the yeast expression vector pCM189 (1) to give the pCM-*SUB1* plasmid used in this study. The DNA encoding 6His-Sub1 was subcloned in a pFastbac1 vector (invitrogen) to give the pFastbac-*SUB1* plasmid. The *SUB1* gene was inactivated or epitope-tagged in different strains as described (2), and modifications of *SUB1* were checked both by PCR analysis with at least 2 sets of primers and Western blot analysis.

**Expression and Purification of Recombinant Sub1.** The pFastbac1-Sub1 plasmid was used for bacmid production according to the manufacturer's protocol. Expression and protein extraction were performed as described (6). High 5 extracts expressing 6His-Sub1 were subjected to chromatography on POROS MC 20 (Applied Biosystems) charged with nickel equilibrated in 20 mM Hepes, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and protease inhibitor mixture (Complete, Roche Applied Science). After washing, proteins were eluted with the same buffer complemented with 300 mM imidazole (pH adjusted to 8). Fractions containing 6His-Sub1 were pooled and further purified on POROS 20 HS (Applied Biosystems) equilibrated in 20 mM Hepes, pH 7.5, 200 mM NaCl, 10% glycerol and 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Proteins were eluted with a 20-column volume linear gradient of NaCl from 0.2 to 1 M. Fractions where rSub1 represents >90% of the total protein content, as judged by SDS/PAGE analysis and Coomassie blue staining, were pooled. Highly purified rSub1 was injected into rabbits and the serum was collected after several immunizations. Recombinant PC4 was overexpressed and purified as described (7).

**Chromatin Immunopurifications Analyzed by PCR or DNA Microarray Hybridization.** ChIP, PCR, and DNA microarray hybridization were performed as described (4, 8). For ChIP on chip experiments, the immunopurified DNA and DNA from the whole-cell extracts of 3HA-Sub1 cells, fluorescently labeled, were competitively hybridized to DNA microarrays harboring 14,172 yeast ORF and intergenic regions. We checked by Western blot analysis that the absence of Sub1 did not significantly change the amounts of TFIIC and TFIIB in these extracts

**Microarray Data Analysis.** Hybridized arrays were scanned by using a GenePix 4000A scanner (Axon Instruments) and fluorescence ratio measurements were determined with the GenePix Pro 6.0 software (Axon Instruments). All array analyses were undertaken by using the Limma package (9) from the R/Bioconductor software (10). ChIP on chip spot intensities have been normalized by using the weighted median as implemented in the *normalizeWithinArrays* function of the Limma package. Normalized measures served to compute the log<sub>2</sub>-ratio for each probe. To identify enriched probes, we have used a moderated *t* test. The moderated *t* test applied here was based on an empirical Bayes analysis and was equivalent to shrinkage (or expansion) of the estimated sample variances toward a pooled estimate, resulting in a more stable inference. However, a one-sided alternative hypothesis was considered, because we expected higher

intensity signal levels in the IP-enriched hybridizations than in the negative control hybridizations.

**Gel Shift Assays.** Protein-DNA interactions were monitored by gel shift assays as described (6) using a <sup>32</sup>P-labeled DNA fragment carrying the tRNA<sup>leu</sup> or the *SUP4* tRNA<sup>Tyr</sup> genes as probes. The amounts of nonspecific DNA plasmid competitor (pBluescript KS) used for EMSA with recombinant fractions (Fig. 3A, C, and D) was correlated to the amount of Sub1 used in each lane (ratio in ng, Sub1/competitor DNA of  $\approx$ 2/1), so that its non specific DNA binding activity was not detected. Note that when rTFIIC and rTFIIB alone or in combination were used, approximately only 1–3 ng of DNA plasmid competitor was used. When yeast TFIIC was used (Fig. 3B), 100 ng of DNA plasmid competitor were added to the reaction. For supershift experiments, preassembled complexes were further incubated at 25 °C during 20 min with 600 ng of anti-Histidine (Qiagen 34660) or anti-Flag M5 (Sigma F-4042) monoclonal antibodies.

**In Vitro Transcription Assays.** The 17-mer assays have been performed as described (11). The 17-, 15-, and 14-mer RNA visualized in Fig. 2B are the most abundant transcripts generated in single round transcription assays (12, 13). For each reaction the amounts of these transcripts were quantified and summed up, using the Quantity One software (Bio-Rad), to estimate transcription initiation levels. Reinitiation assays on the *SUP4*-tDNA<sup>Tyr</sup> or the tDNA<sup>leu</sup> (TAT) genes were performed as described (14) with the amounts of proteins used for multiple round of transcription assays, excepted when indicated. Transcriptions with crude extracts (50  $\mu$ g) were incubated for 60 min at 25 °C, in the presence of 40 ng of the plasmid template.

**Far Western Blot.** The pScodon-*SUB1* plasmid was linearized with BamHI and used in a TNT transcription/translation kit (Promega) in the presence of [<sup>35</sup>S]methionine to generate a labeled Sub1. rSub1, rPC4, rTFIIIA, rTFIIC, rTBP, rBrf1 and rBdp1 were subjected to SDS/PAGE and blotted onto nitrocellulose. Hybridization and washes were performed as described (15) except that the rSub1 probe was purified on MicroSpin G-25 columns (GE Healthcare) and that the membranes were first stained with Ponceau S (Sigma) then destained with water before their incubation with the blocking buffer. Labeled proteins were revealed by autoradiography or visualized with a Typhoon 9200 Imager (Amersham Biosciences).

**Pulse Labeling.** Wild type and *sub1* $\Delta$  cells transformed with pCM189 vector or pCM-*SUB1* plasmid were grown in Casamino Acids medium supplemented with adenine (20  $\mu$ g/mL) to midlog phase (OD<sub>600</sub> = 0.5). Total RNAs were labeled for 10 min by adding 150  $\mu$ Ci of (5,6-<sup>3</sup>H)-uracil (1 mCi/mL) to 10 mL of cell cultures as described (16). Three micrograms of total RNA were analyzed by gel electrophoresis under denaturing conditions (acrylamide 8%, urea 7 M). The gel was stained with ethidium bromide, processed for fluorography with Amplify (GE Healthcare) and then dried before autoradiography. Quantitation of images of fluorographs or stained gels, acquired with a scanner, was performed by using the Quantity One software (Bio-Rad). Transcription signals were normalized against RNA recovery as determined by analysis of stained gels. Note that similar results were observed when Sub1 was overexpressed from a multicopy plasmid.



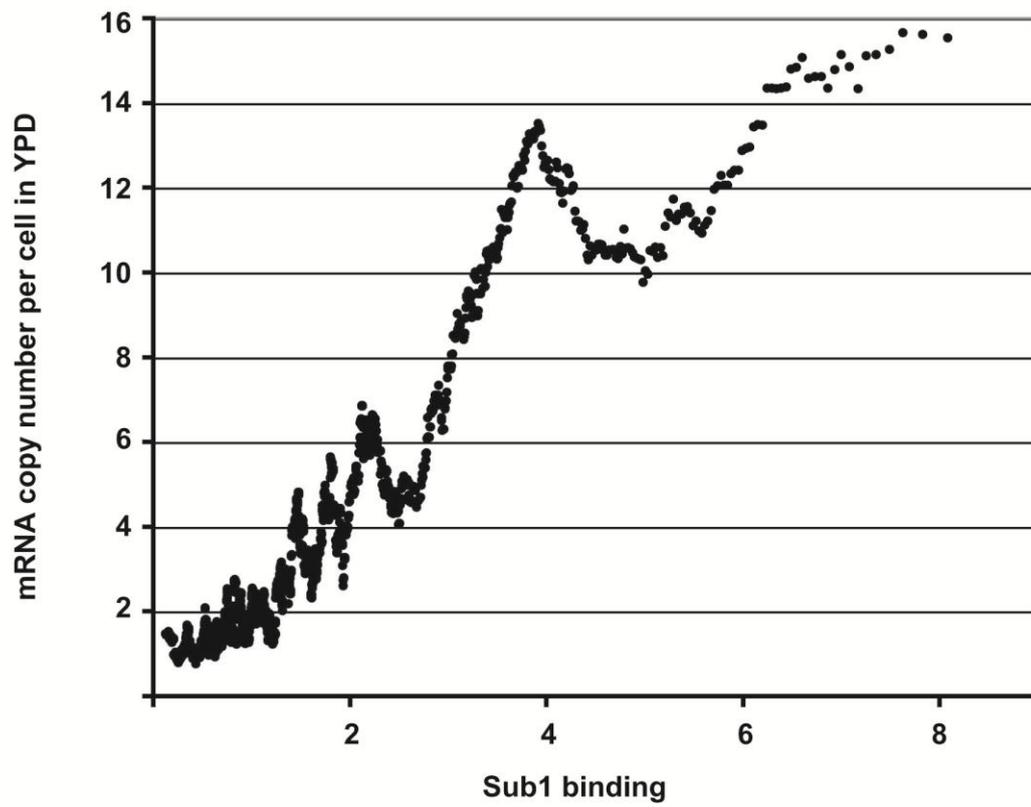
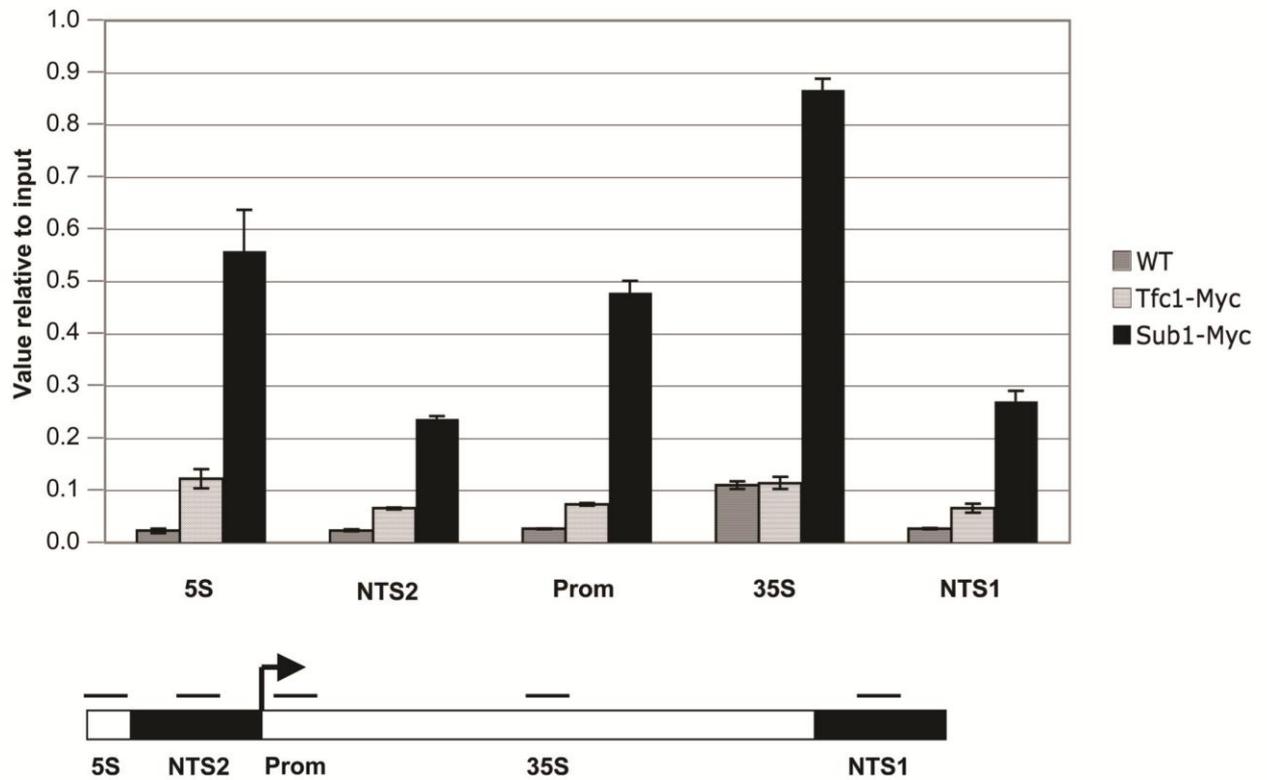
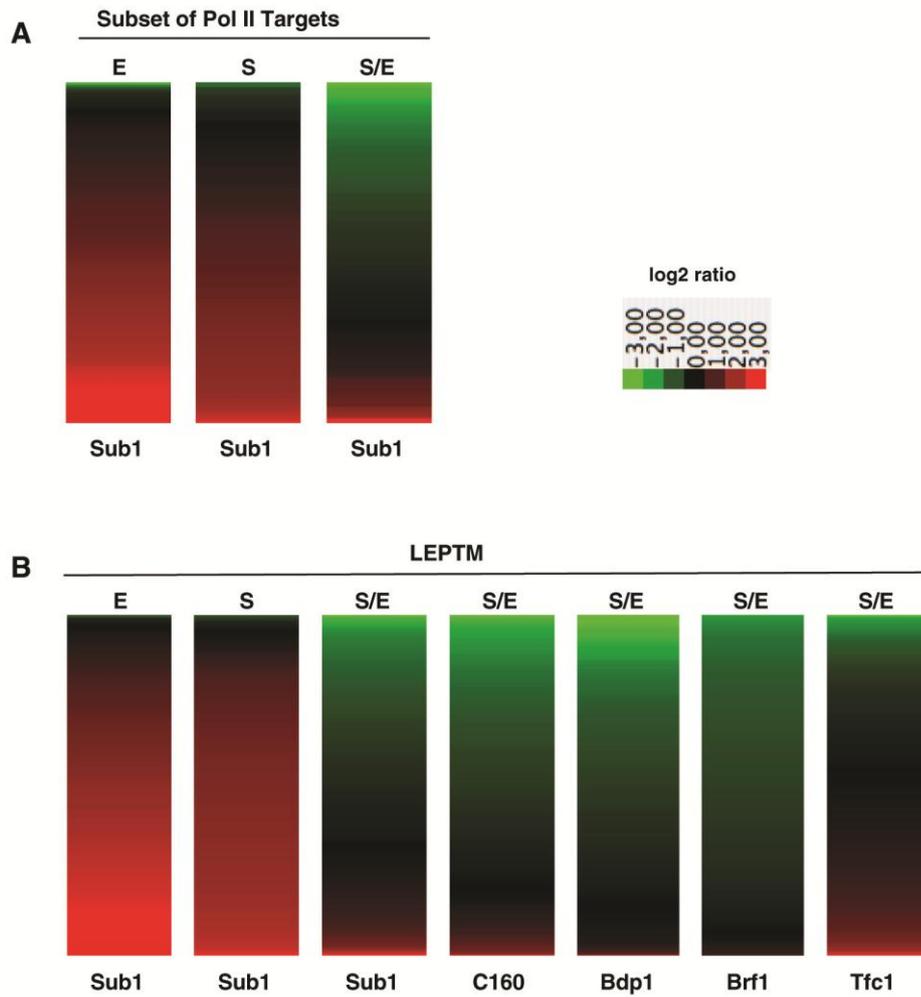


Fig. S1. Sub1-3HA binds preferentially to ORF with high transcriptional activity. The moving average (window size = 100, step size = 1) of Sub1-3HA enrichment on an ORF is plotted as a function of mRNA molecule copy number per cell (18).



**Fig. S2.** Sub1 binds to the rDNA locus. Immunoprecipitations from wild type (WT), Tfc1-13myc or Sub1-13myc cross-linked chromatin were analyzed via quantitative PCR. The amounts of immunoprecipitated DNA expressed as a value relative to that of the input are shown as histograms. Sequence elements within the rDNA unit (Non-Transcribed Spacer 1 and 2, 5S DNA and 35S DNA) and the positions of the amplified DNA fragments are schematically represented. Note that although 5S DNA is transcribed by Pol III, the binding of TFIIC to these loci could not be detected by ChIP (4).



**Fig. S3.** Differential binding of Sub1 to a subset of Pol II targets or to the LEPTM in exponential or stationary phase. Immunopurified DNA and DNA from Sub1-3HA whole-cell extracts, prepared from cells grown to exponential or stationary phase were competitively hybridized to DNA microarrays. Sub1 occupancy in exponential (E) or stationary (S) phase or its differential binding in both growth conditions (S/E) to (A) a subset of Pol II targets (*ACT1*, *ADH1*, *PMA1*, *CDC19*, Histone genes and 133 RP genes) or (B) Pol III-transcribed genes (LEPTM) are presented according to the red-green color scale with a different gene/loci order in the y axis to allow the comparison with the differential binding of C160, Bdp1, Brf1 or Tfc1 to LEPTM in exponential or stationary phase published in Oficjalska-Pham et al. (2006). See also accompanying Datasets S1 and S2.







## 2.4 Résultats et discussions

### 2.4.1 Localisation de Sub1 sur le génome

L'analyse de l'occupation de Sub1 sur le génome a été réalisée par immunoprécipitation de la chromatine (*ChIP*) suivie d'une hybridation comparative sur puce à ADN (*ChIP on chip*) (figure 1 de l'article). La puce à ADN utilisée présente non seulement des ORF (*open reading frames* ; cadres de lecture ouverts) mais également des régions intergéniques contenant des gènes de classe III (Harismendy et al., 2003). Environ un quart des loci sur lesquels Sub1 est retrouvé sont situés dans des ORF qui représentent globalement des gènes activement transcrits. Cette observation est en accord avec la fonction de coactivateur de Sub1 dans la transcription par l'ARN Pol II.

Les autres loci sur lesquels Sub1 est retrouvé correspondent à des régions intergéniques et à des gènes non traduits. On y trouve de manière intéressante les LEPTM (*loci enriched by the Pol III transcription machinery*) (Harismendy et al., 2003) qui contiennent les gènes d'ARNt, *RDN5*, *SNR6*, *RPR1* et *SCR1*, tous transcrits par l'ARN Pol III. Des expériences complémentaires de *ChIP* couplées à des amplifications d'ADN par PCR quantitative confirment la présence de Sub1 sur des gènes de classe III. La protéine Sub1 est donc *in vivo* associée aux gènes de classe III en conditions standard de croissance.

Parmi les gènes transcrits par l'ARN Pol II et occupés par Sub1, on retrouve les ARNsno (pour *small nuclear RNA*), une trentaine de gènes codant pour des constituants de la paroi cellulaire, des gènes d'histones et des gènes codant pour des composants nécessaires à la machinerie de traduction, dont notamment une cinquantaine de gènes spécifiant des protéines ribosomiques. De manière intéressante, ces gènes auxquels Sub1 est associé correspondent à des gènes importants pour la croissance cellulaire. Sub1 pourrait donc réguler directement la croissance cellulaire.

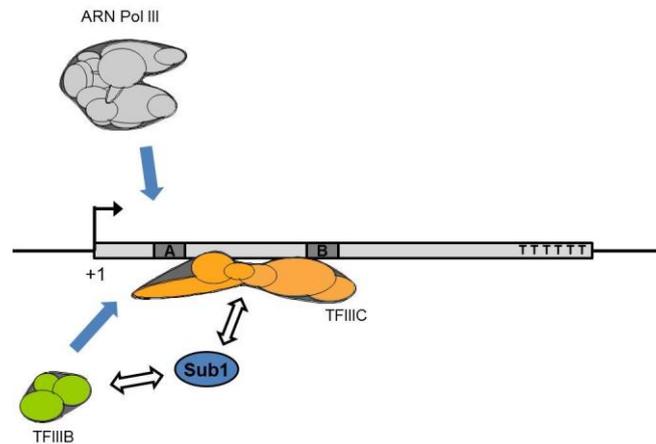
### 2.4.2 Sub1 stimule deux étapes de la transcription : l'initiation et la réinitiation facilitée

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence que Sub1 pouvait avoir sur la transcription par l'ARN Pol III *in vitro* et *in vivo*.

Pour cela, nous avons examiné l'effet de Sub1 sur un système de transcription reconstitué *in vitro* avec des facteurs recombinants et l'ARN Pol III purifiée. L'ajout de la protéine Sub1 recombinante dans ce système de transcription conduit à la stimulation de la transcription spécifique d'un gène d'ARNt<sup>Tyr</sup>, d'un gène d'ARNt<sup>leu</sup> et du gène *RDN5* de l'ARNr 5S. Plus précisément, Sub1 est capable de stimuler la transcription *in vitro* par l'ARN Pol III à deux étapes particulières : l'initiation et la réinitiation facilitée.

En effet, lorsque la transcription par l'ARN Pol III *in vitro* d'un ARN est limitée par l'absence d'un nucléotide dans le milieu réactionnel, la réinitiation n'a pas lieu et seule l'initiation de la transcription permet d'aboutir à la synthèse d'un oligomère. Dans ces expériences, l'ajout de Sub1 recombinant stimule la synthèse de cet oligomère, sans toutefois améliorer la sélection du site

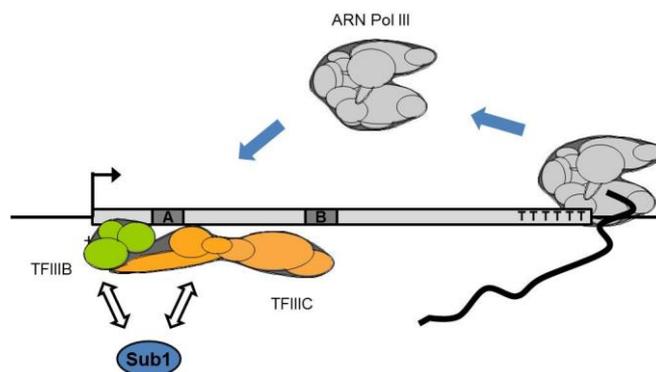
d'initiation : plusieurs transcrits de tailles différentes sont obtenus, correspondant à des sites d'initiation différents. De plus, des expériences de retard sur gel montrent qu'en présence de Sub1, la fixation de TFIIC sur l'ADN augmente. Sub1 semble également permettre un meilleur recrutement de TFIIB dans le complexe de préinitiation. Sub1 est donc capable de stimuler en particulier l'étape d'initiation de la transcription par l'ARN Pol III *in vitro* (figure 21).



**Figure 21. Sub1 interagit directement avec TFIIB et TFIIC**

Par ailleurs, Sub1 intervient également dans l'étape de réinitiation de la transcription par l'ARN Pol III. La transcription de gènes d'ARNt avec le système reconstitué *in vitro* avec les facteurs de transcription recombinants permet de réaliser à peine deux cycles de transcription tandis que celle obtenue avec la fraction B'' (contenant Bdp1 partiellement purifié) permet d'en réaliser au moins 15. L'ajout de Sub1 dans le système composé des facteurs recombinant conduit à plus de 20 cycles de transcription : Sub1, de manière comparable à la fraction B'', est capable de stimuler la réinitiation facilitée *in vitro*.

Sub1 pourrait stimuler la réinitiation en stabilisant les facteurs TFIIC et TFIIB sur les promoteurs des gènes (figure 22). Une fois que l'ARN Pol III termine la transcription et clive l'ARN transcrit, elle serait alors immédiatement recyclée et recrutée par les facteurs de transcription déjà stabilisés sur les promoteurs. La réinitiation facilitée serait ainsi stimulée.



**Figure 22. Sub1 stimule la réinitiation**

Plusieurs expériences nous montrent que Sub1 s'associe avec des composants de la machinerie de transcription. Des *western-blot* indiquent que Sub1 est présent dans la fraction partiellement purifiée B''. Et des expériences de *far-western* montrent que Sub1 s'associe non seulement avec la sous-unité Bdp1 de TFIIB et les sous-unités  $\tau 95$  et  $\tau 138$  de TFIIC, mais également avec Sub1 lui-même, tout comme PC4 qui est capable de se dimériser (Kretzschmar et al., 1994 ; Wertzen et al., 1998a).

### 2.4.3 Sub1 est requis pour une transcription par l'ARN Pol III optimale

Parallèlement à nos expériences réalisées *in vitro*, nous nous sommes intéressés au lien *in vivo* entre Sub1 et la machinerie de transcription par l'ARN Pol III. Nous avons analysé l'effet de la délétion de *SUB1* sur la transcription par l'ARN Pol III dans des levures. Bien que l'inactivation de Sub1 n'affecte pas la quantité des ARN totaux des cellules, le marquage des ARN néosynthétisés au tritium révèle que la transcription des ARNt diminue d'environ 40% dans la souche *sub1Δ* par rapport à la souche sauvage. De plus, la transcription du gène *SUP4* de l'ARNt<sup>Tyr</sup> à partir d'extraits de la souche *sub1Δ* est réduite par rapport à une transcription obtenue avec des extraits d'une souche sauvage. De même, des expériences d'extension d'amorces (*primer extension*) réalisées à partir des ARN extraits des levures indiquent que la néosynthèse des ARNt est réduite d'environ 35% dans une souche délétée pour *SUB1* comparée à une souche sauvage.

Enfin, nous avons étudié l'occupation des facteurs de transcription TFIIB et TFIIC sur deux gènes de classe III dans une souche sauvage et *sub1Δ*. Les *ChIP* réalisées nous indiquent que dans une souche dépourvue de Sub1, le facteur TFIIB est moins présent sur les gènes que dans une souche sauvage, alors que l'occupation de TFIIC sur ces mêmes gènes reste inchangée. Ces résultats sont en accord avec les précédentes expériences *in vitro* qui montrent que Sub1 aiderait TFIIC à recruter TFIIB sur les gènes de classe III.

Sub1 est donc requis *in vivo* pour une transcription par l'ARN Pol III optimale.

### 2.4.4 Sub1 est-il impliqué dans la transcription par l'ARN Pol I ?

Etant donné que Sub1 est un régulateur bien étudié de la transcription par l'ARN Pol II et que nous l'avons caractérisé en tant qu'activateur de la transcription par l'ARN Pol III, nous pouvons nous demander si Sub1 est également impliqué dans la transcription par l'ARN Pol I. L'occupation du gène spécifiant l'ARNr 35S par Sub1 nous le suggère (figure S2 en annexe de l'article). Cependant, le marquage des ARN néosynthétisés nous montre que l'ARNr 5,8S est légèrement moins transcrit dans une souche dépourvue de Sub1, mais cette expérience ne nous permet pas de détecter une différence pour les ARNr 25S et 18S également transcrits par l'ARN Pol I. De plus, les expériences d'extension d'amorce à partir d'ARN extraits d'une souche *sub1Δ* ne révèlent aucune variation de la quantité d'ARNr 35S transcrit. Ces résultats préliminaires n'excluent pas la possibilité que Sub1 soit

impliqué dans la transcription par l'ARN Pol I mais ne permettent pas de préciser quel lien pourrait exister entre eux.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la protéine Sub1, bien qu'elle ne soit pas essentielle, est requise pour une transcription par l'ARN Pol III optimale *in vivo*. Au cours de notre étude, nous nous sommes principalement intéressés à la fonction de Sub1 en phase exponentielle de croissance. Mais la transcription par l'ARN Pol III peut-elle être régulée *via* Sub1, dans d'autres conditions de croissance ? Cette question fait en partie l'objet du chapitre suivant.



---

## Chapitre 3

# Interactions de Sub1 et régulation de la transcription par l'ARN Pol III

---

### 3.1 Introduction

A partir du moment où nous avons caractérisé Sub1 comme un activateur de la transcription par l'ARN polymérase III dans l'étude consacrée au chapitre précédent, nous nous sommes demandés comment replacer cette fonction de Sub1 dans la cellule *in vivo*. En effet, « quand » et « pourquoi » cet activateur, qui n'est pas essentiel à la cellule, est-il nécessaire ? Dans quelles conditions et par rapport à quelles voies métaboliques la fonction de Sub1 aurait-elle son importance ? Et finalement, avec quels partenaires interagirait-il alors, hors machinerie de transcription ?

Au cours de notre recherche de partenaires et de conditions d'étude *in vivo* de l'activateur Sub1, la protéine Maf1 est apparue en candidat de choix : étant à ce jour le seul répresseur général connu de la transcription par l'ARN Pol III, il nous a paru intéressant de le comparer à l'activateur Sub1. Leur action est-elle directement antagoniste ? Quelles sont les conditions dans lesquelles chacun est requis : les mêmes conditions de régulation ou bien des conditions de régulation différentes ? Peuvent-ils interagir directement l'un avec l'autre ?

Dans cette perspective, nous nous intéresserons au comportement des souches délétées pour le gène *SUB1*, pour le gène *MAF1* et pour les deux gènes à la fois. L'étude de ces mutants a été réalisée dans des conditions dans lesquelles la transcription, plus particulièrement la transcription par l'ARN Pol III, est affectée. Nous avons alors décidé de nous placer dans des conditions mimant une carence nutritionnelle ou bien dans des conditions où l'ADN est endommagé, dont l'impact sur la transcription par l'ARN Pol III et où l'implication du répresseur Maf1 ont été décrits en introduction. Nous avons également choisi d'étudier ces délétions en phase stationnaire de croissance, où le répresseur Maf1 et l'activateur Sub1 pourraient réguler la transcription par l'ARN Pol III.

Ensuite, nous nous sommes demandés plus largement avec quels autres partenaires Sub1 pourrait interagir. Nous connaissons déjà plusieurs autres fonctions de Sub1 et de son orthologue PC4 : dans la transcription par l'ARN Pol II, dans l'osmoréponse, dans la réparation de l'ADN... Mais ces autres fonctions de Sub1 sont-elles liées à son activité régulatrice de la transcription par l'ARN Pol III ? A partir d'une liste non exhaustive recensant des interactions décrites dans la littérature entre le gène *SUB1* ou la protéine Sub1 et d'autres gènes ou protéines, nous souhaitons mettre en évidence celles qui impliquent la fonction d'activateur de la transcription par l'ARN Pol III de Sub1.

Notre démarche a été de construire des doubles délétants (délétion simultanée du gène du partenaire potentiel et du gène *SUB1*) et d'analyser leur phénotype. Par l'étude de ces doubles délétants, nous avons cherché à rattacher la fonction d'activateur de la transcription par l'ARN Pol III de Sub1 à des conditions de croissance définies et à discerner les voies métaboliques dans lesquelles le régulateur Sub1 pourrait être impliqué.

## 3.2 Etude des fonctions respectives de Sub1 et Maf1 dans la transcription par l'ARN Pol III

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés au lien potentiel entre l'activateur Sub1 et le répresseur Maf1 de la transcription par l'ARN Pol III. Pour cela, des souches haploïdes de levure *S. cerevisiae* ont été délétées pour les gènes *SUB1* et *MAF1* ainsi que pour les deux gènes à la fois. Nous avons étudié dans un premier temps le phénotype de ces souches dans des conditions standard de croissance puis dans des conditions de stress. Dans un second temps, nous avons comparé la transcription par l'ARN Pol III dans ces mutants. Enfin, nous avons étudié les protéines Sub1 et Maf1 en essayant d'analyser leurs éventuelles modifications et leur localisation cellulaire dans différentes conditions de croissance.

### 3.2.1 Croissance des souches *sub1Δ*, *maf1Δ* et *sub1Δ maf1Δ*

De premières observations au microscope indiquent que la forme et la taille des levures mutantes semblent similaires à celles de la souche sauvage. Par ailleurs, la croissance des souches délétées pour *SUB1* et/ou *MAF1* en milieu riche est similaire à la croissance de la souche sauvage. Toutefois, lorsqu'elles sont incubées à différentes températures ou en présence de certaines drogues, les souches mutées peuvent révéler des sensibilités différentes (figure 23).

La croissance des quatre souches sauvage, *sub1Δ*, *maf1Δ* et *sub1Δ maf1Δ* a été observée à **différentes températures** : 16°C, 23°C, 25°C et 37°C en comparaison à la température standard de croissance, 30°C. La croissance des quatre souches a également été observée en présence de plusieurs drogues susceptibles d'affecter la croissance cellulaire :

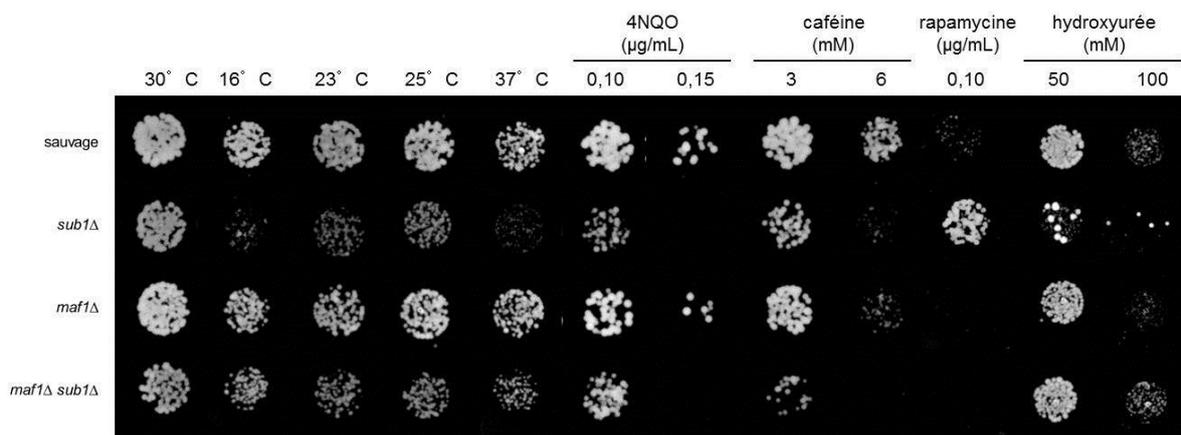
- le **4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)**, qui est considéré comme un mimétique des UV : il cause des lésions à l'ADN en formant des liaisons avec les purines (Kanojia et Vaidya, 2005),
- l'**hydroxyurée (HU)**, un inhibiteur de la réplication de l'ADN (Koç et al., 2004),
- la **caféine**, une molécule ciblant plusieurs voies métaboliques impliquant généralement l'AMPC-phosphodiesterase et TORC1 (Kuranda et al., 2006 ; Wanke et al., 2008),

- la **rapamycine**, qui inhibe spécifiquement TORC1, mimant ainsi une carence en nutriments (pour revues, De Virgilio et Loewith, 2006 ; Wullschleger et al., 2006).

La croissance de la souche sauvage est particulièrement affectée en présence des quatre drogues. La croissance de la souche *maf1Δ* est similaire à celle de la souche sauvage sauf en caféine et en rapamycine, où elle est plus sensible. Cette sensibilité à la rapamycine est en accord avec le fait que la protéine Maf1 soit impliquée dans la voie Tor, où TORC1 est la cible de la rapamycine : Maf1, en tant que répresseur transcriptionnel, participe à la survie de la cellule en réponse au stress.

Quant à la souche *sub1Δ*, elle est non seulement cryosensible et thermosensible, mais est également plus sensible que la souche sauvage ou *maf1Δ* en présence de 4NQO, caféine et HU. En contraste, la souche *sub1Δ* est résistante à la rapamycine.

La souche double mutante *sub1Δ maf1Δ* est également cryosensible et thermosensible, en présentant un phénotype intermédiaire à ceux des simples délétants. En 4NQO, la croissance de *sub1Δ maf1Δ* est affectée de manière identique à la souche *sub1Δ*. En rapamycine et en caféine, la souche double délétante est par contre aussi sensible que la souche *maf1Δ*. Enfin, en présence de caféine, la souche *sub1Δ maf1Δ* semble plus sensible que les deux simples délétants.



**Figure 23. Croissance des souches de *S. cerevisiae* délétées pour *SUB1* et/ou *MAF1* sur différents milieux**

Chacune des quatre souches sauvage (souche YPH500), *sub1Δ*, *maf1Δ* et *sub1Δ maf1Δ* a été déposée en gouttes soit sur des milieux riches et incubée à différentes températures (16°C, 23°C, 25°C, 30°C ou 37°C), soit sur des milieux additionnés de drogues (4NQO, caféine, rapamycine ou hydroxyurée) et incubée à 30°C.

A travers ces premiers tests phénotypiques, nous pouvons voir que les protéines Sub1 et Maf1 interagissent de manière différente et complexe, selon les stress (tableau 2). En présence de 4NQO, seule la protéine Sub1 semble nécessaire à la réponse au stress. En présence de caféine, la souche double délétante accumulerait les défauts des deux simples délétants, suggérant que Sub1 et Maf1 participent à la réponse à ce stress, mais chacun dans des cascades de signalisation parallèles. Concernant la rapamycine et l’HU, Sub1 et Maf1 seraient impliqués dans la même voie de signalisation.

4NQO	caféine	rapamycine	HU
Sub1 impliqué Maf1 pas impliqué	Sub1 et Maf1 impliqués indépendamment	Sub1 et Maf1 impliqués dans la même voie	Sub1 et Maf1 impliqués dans la même voie

**Tableau 2. Maf1 et Sub1 dans la réponse au 4NQO, à la caféine, à la rapamycine et à l’HU**

Malheureusement, ces tests de croissance ne nous permettent pas d’établir un lien clair général entre les deux protéines Sub1 et Maf1. Comme Sub1 possède plusieurs fonctions différentes au sein de la cellule, sa délétion peut entraîner des effets pléiotropiques, ce qui rend l’interprétation de ces résultats plus complexes en regard des différentes drogues testées.

C’est pourquoi nous nous sommes ensuite concentrés sur les phénotypes transcriptionnels de ces mutants : comment la transcription par l’ARN Pol III est-elle affectée ? Peut-on replacer l’activateur Sub1 et le répresseur Maf1 au sein d’une même cascade de régulation par rapport au seul phénotype transcriptionnel ?

Pour la suite de notre étude, nous avons choisi d’utiliser deux des quatre drogues précédentes :

- la rapamycine, dont on connaît l’effet sur la voie Tor et sur Maf1 (cf. introduction) et qui pourrait également impliquer Sub1,
- le 4NQO, auquel Maf1 ne semble pas réagir au premier abord mais qui pourrait moduler la transcription par l’ARN Pol III en tant que mimétique d’un stress aux UV, comme le MMS ou l’HU (cf. introduction).

### 3.2.2 Comparaison des niveaux de transcrits Pol III dans les souches délétées pour *SUB1* et/ou *MAF1*, en 4NQO ou en rapamycine

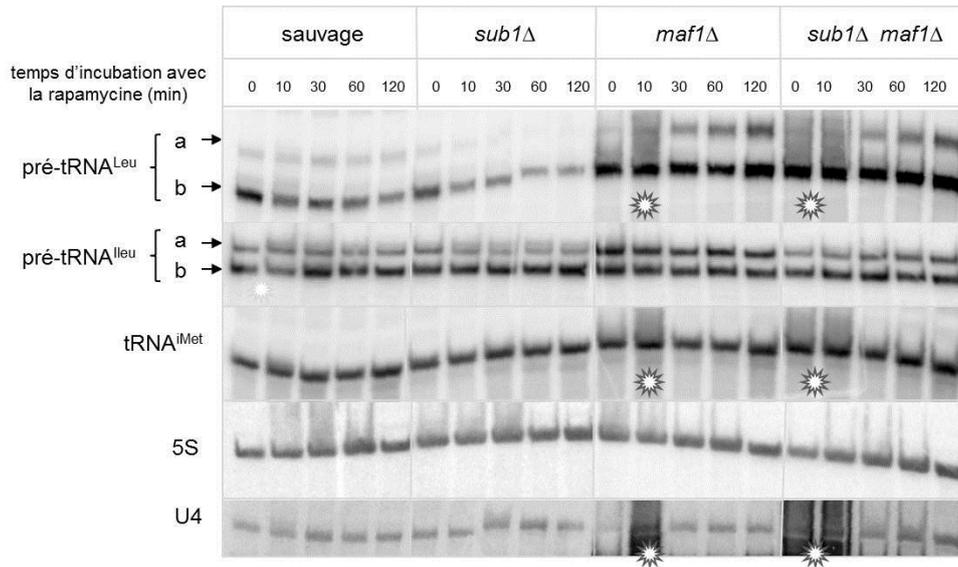
Dans l’optique d’étudier le lien entre l’activateur Sub1 et le répresseur Maf1 sur le mécanisme de transcription par l’ARN polymérase III, nous nous sommes intéressés aux ARN transcrits par l’ARN Pol III dans chacune des quatre souches sauvage, *sub1Δ*, *maf1Δ* et *sub1Δ maf1Δ*. Nous nous sommes placés dans deux conditions où la transcription par l’ARN Pol III est régulée dans la souche sauvage : en rapamycine, mimétique d’une carence en nutriments, et en 4NQO, mimétique d’un rayonnement aux UV. Dans ces deux cas, on sait que la transcription est réprimée.

Deux méthodes expérimentales ont été employées pour observer les ARN transcrits. Tout d’abord, quelques ARN transcrits par l’ARN Pol III ont été détectés grâce à des sondes radioactives (par *northern-blot*), parmi les ARN extraits des souches traitées au 4NQO ou à la rapamycine. Ensuite, nous avons réalisé un marquage à l’uracile tritié de l’ensemble des ARN néosynthétisés dans chacune des souches traitées.

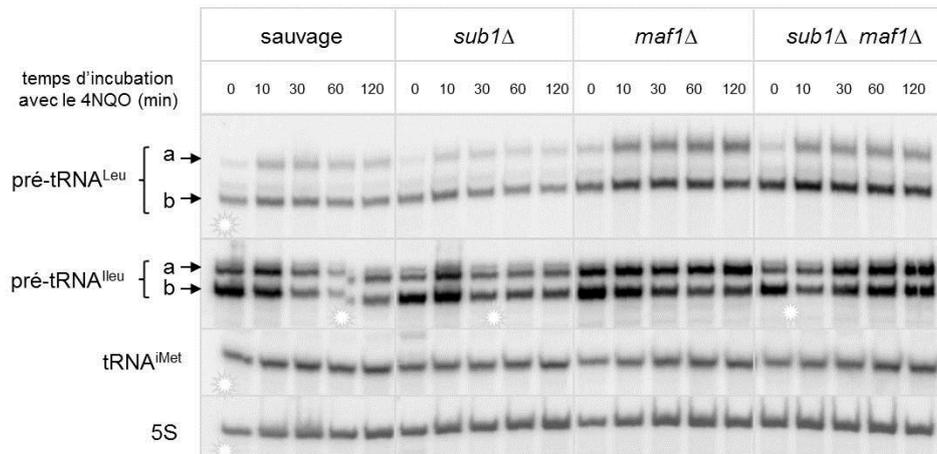
#### 3.2.2.1 Analyse des ARN transcrits par l’ARN Pol III par détection ciblée

A partir des souches de levure *S. cerevisiae* traitées au 4NQO ou à la rapamycine où *SUB1* et/ou *MAF1* ont été délétés, les ARN ont été extraits et analysés par *northern-blot* : des sondes révélant plusieurs formes de précurseurs des ARNt<sup>Leu</sup> et ARNt<sup>Ileu</sup> (sondes hybridant dans un intron du pré-ARNt) ainsi que les transcrits matures de l'ARNt<sup>iMet</sup> et de l'ARNr 5S ont été utilisées (figure 24).

**A**



**B**



**Figure 24. Détection de transcrits Pol III dans les souches délétées pour le gène *SUB1* et/ou *MAF1* au cours d'un traitement à la rapamycine ou au 4NQO**

Les quatre souches sauvage (YPH500), *sub1Δ*, *maf1Δ* et *sub1Δ maf1Δ* ont été incubées avec de la rapamycine à 0,4 mg/mL (panneau A) ou avec du 4NQO à 1 µg/mL (panneau B). Pour chaque souche, des cellules ont été prélevées avant ajout de la drogue (temps 0 min), puis après 10 min, 30 min, 60 min et 120 min après ajout de la drogue. Les ARN extraits de chaque prélèvement ont été déposés (à ARN constant) sur un gel d'acrylamide puis transférés sur membrane de nitrocellulose. La membrane a été incubée avec différentes sondes radioactives révélant les ARN et pré-ARNt indiqués sur la gauche.

Différentes formes des précurseurs des ARNt<sup>Leu</sup> et ARNt<sup>Ileu</sup> ont été repérées (signaux fléchés a et b).

Les étoiles bordées de gris clair indiquent une zone où les extraits ont été mal transférés et les étoiles bordées de gris foncé indiquent une légère dégradation des extraits (d'après une observation de la coloration globale des ARN au bleu de méthylène).

Le signal de l'ARNr 5S, dont on sait que la quantité reste stable dans les cellules, nous sert de contrôle de dépôt et de transfert des ARN lors du *northern-blot*. Un autre contrôle, l'ARNsn U4, synthétisé par l'ARN Pol II, a également été détecté (donnée non montrée pour les expériences au 4NQO) et présente un profil identique à celui de l'ARNr 5S, c'est-à-dire qu'il semble constant dans chaque extrait analysé, même s'il est moins abondant.

L'ARNt<sup>iMet</sup> est un ARNt particulier : il porte l'acide aminé méthionine qui est nécessaire à l'initiation de la traduction des ARNm. L'analyse de ce transcrite ARNt<sup>iMet</sup> nous intéresse dans la mesure où cet ARNt<sup>iMet</sup> est un facteur limitant du mécanisme traductionnel, donc limitant pour la synthèse protéique et la croissance cellulaire. Nous avons souhaité savoir si la transcription de cet ARNt<sup>iMet</sup> était régulée par *SUB1* et/ou *MAF1* au cours des réponses au stress 4NQO ou rapamycine. Dans nos expériences, il semble que le niveau du transcrite ARNt<sup>iMet</sup> soit constant au cours du temps : dans ces conditions de régulation, ni la délétion de *SUB1* et ni celle de *MAF1* n'influence la transcription *in vivo* de l'ARNt<sup>iMet</sup>.

Dans les souches sauvage et *sub1Δ*, alors que les signaux des précurseurs de l'ARNt<sup>Leu</sup> diminuent au cours du traitement à la rapamycine, ils semblent plutôt constants lors du traitement au 4NQO. De plus, ces signaux sont plus faibles que ceux des souches *maf1Δ* et *sub1Δ maf1Δ* où leur signal augmente. Cette observation est similaire au résultat de l'étude d'Upadhy et al., 2002, qui étudie entre autres l'effet de la rapamycine, et témoigne du fait que Maf1 soit requis pour la répression de la transcription des gènes de ces ARNt dans les deux conditions de stress testées.

Pour l'ARNt<sup>Leu</sup>, les niveaux des précurseurs restent plutôt constants en présence de rapamycine et diminuent en présence de 4NQO dans les souches sauvage et *sub1Δ*, à l'inverse de l'ARNt<sup>Leu</sup>. Néanmoins, comme pour l'ARNt<sup>Leu</sup>, les signaux des transcrits dans les souches *maf1Δ* et *sub1Δ maf1Δ* augmentent par rapport à ceux des souches sauvage et *sub1Δ*.

Une nuance peut donc être apportée suivant les précurseurs d'ARNt observés et selon la drogue utilisée.

Ces observations montrent que la transcription de ces ARNt serait réprimée dans les souches sauvage et *sub1Δ* : le stock des ARNt serait alors soit stable, soit insuffisamment renouvelés et/ou dégradés, d'où une diminution des précurseurs. La néosynthèse de ces deux ARNt n'est, dans ces deux souches, plus assurée en conditions de stress.

Dans les souches délétées pour le gène *MAF1*, on observe qu'avant l'ajout de l'une ou l'autre des drogues (temps 0 min, c'est-à-dire sans aucun traitement), les signaux des précurseurs d'ARNt<sup>Leu</sup> et d'ARNt<sup>Leu</sup> sont plus élevés que dans la souche sauvage. Cette observation n'a pas été rapportée dans d'autres études : est-ce dû aux ARNt étudiés, ou bien au fond génétique différent des souches utilisées ? Dans le cas de nos souches, Maf1 pourrait-il déjà réprimer la transcription de deux ARNt en conditions standard de croissance ?

De plus, dans le cas des précurseurs de l'ARNt<sup>Leu</sup>, la délétion supplémentaire de *SUB1* ajoutée à celle de *MAF1* rétablit un niveau de signal comparable à celui de la souche sauvage. Dès lors que Maf1 n'est pas exprimé, et sans aucun stress, la protéine Sub1 pourrait déjà stimuler la néosynthèse de l'ARNt<sup>Leu</sup>. L'activateur Sub1 serait-il dédié à la transcription de seulement certains et non pas l'ensemble des gènes de classe III ?

En résumé, ces expériences semblent confirmer l'activité de répresseur de Maf1 dans la transcription par l'ARN Pol III. Malheureusement, aucun lien clair n'est mis en évidence entre les deux régulateurs Sub1 et Maf1 de la transcription par l'ARN polymérase III au cours de ces stress.

Par ailleurs, ces détections par *northern-blot* révèlent finalement des différences pour les ARN<sup>t<sup>Met</sup></sup>, ARN<sup>t<sup>Leu</sup></sup> et ARN<sup>t<sup>Ileu</sup></sup> étudiés au cours d'un stress. L'étude de si peu de transcrits par *northern-blot* s'avère limitée pour l'analyse de l'effet transcriptionnel des deux régulateurs. C'est pourquoi nous avons par la suite choisi de marquer l'ensemble des ARN néosynthétisés *in vivo*, à l'uracile tritié.

### 3.2.2.2 Analyse des ARN transcrits par l'ARN Pol III par marquage *in vivo* des ARN

A partir des mêmes souches de *S. cerevisiae* construites au laboratoire, nous avons procédé au marquage des ARN néosynthétisés pendant un certain laps de temps (10 min) après un traitement à la rapamycine ou au 4NQO. Les ARN ont ensuite été extraits et séparés sur un gel d'acrylamide puis exposés contre un film autoradiographique. Cette méthode donne une vision plus globale de la transcription par rapport aux *northern-blots* : ils nous permettent d'observer l'ensemble des ARN néosynthétisés. Sur la figure 25 sont indiqués les signaux correspondants à l'ensemble des ARN<sup>t</sup> et le signal correspondant à l'ARNr 5S néosynthétisés suite au traitement à la rapamycine ou au 4NQO.

Dans ces expériences, on observe dans un premier temps que les traitements à la rapamycine et au 4NQO conduisent à la répression de la transcription des ARN<sup>t</sup> et de l'ARNr 5S dans la souche sauvage.

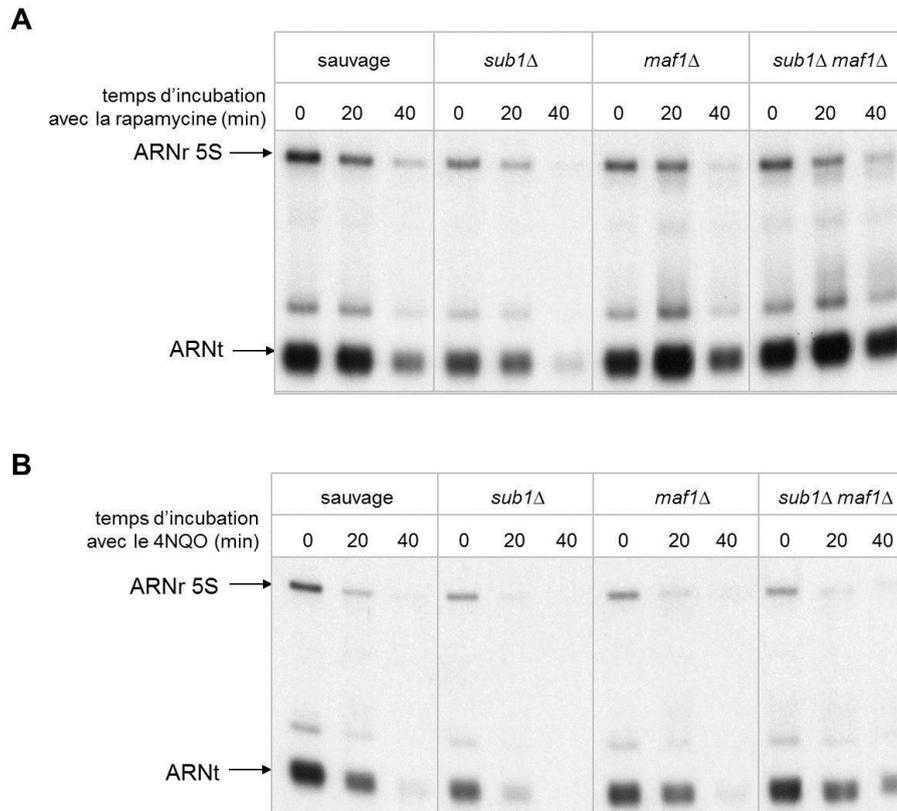
Au cours des deux traitements, la souche délétée pour le gène *SUB1* présente une néosynthèse de ces transcrits plus faible que pour la souche sauvage, dès le temps 0. Cette observation confirme la fonction de Sub1 en tant qu'activateur de la transcription par l'ARN Pol III. Au cours des stress, dans la souche *sub1Δ*, soit l'activité transcriptionnelle par l'ARN Pol III reste plus faible que dans une souche sauvage et la répression par les drogues est la même dans les deux souches, soit la répression par les drogues est plus forte dans la souche *sub1Δ* que dans la souche sauvage.

Dans la souche *maf1Δ*, le traitement à la rapamycine ne conduit plus à la répression de la transcription des ARN<sup>t</sup> et de l'ARNr 5S, en accord avec la fonction de répresseur de Maf1. Par contre, pendant le traitement au 4NQO, la souche *maf1Δ* présente les mêmes signaux que la souche sauvage : la transcription par l'ARN Pol III serait quand même réprimée en l'absence de Maf1 au cours de ce stress. Dans cette condition, la répression de la transcription par l'ARN Pol III impliquerait au moins un répresseur autre que la protéine Maf1.

De plus, on observe par ces marquages que la délétion de Maf1 ne conduit à aucune variation du niveau de transcription au temps 0 par rapport à la souche sauvage : contrairement à ce que semblaient indiquer les *northern-blots* pour deux ARN<sup>t</sup>, la transcription par l'ARN Pol III de l'ensemble des ARN<sup>t</sup> ne paraît pas affectée en conditions standard de croissance.

En ce qui concerne la souche double délétante *sub1Δ maf1Δ*, la transcription par l'ARN Pol III sans aucun stress (temps 0) est aussi forte que dans la souche sauvage et *maf1Δ* : la délétion de *MAF1* en plus de celle de *SUB1* semble restaurer le défaut transcriptionnel de *sub1Δ*. Par ailleurs, au cours du traitement à la rapamycine ou au 4NQO, la souche double délétante synthétiserait non

seulement plus d'ARNt que la souche sauvage, mais également plus que la souche *maf1Δ*, au bout de 40 min de traitement. Ainsi, en rapamycine, la dérégulation de la transcription par l'ARN Pol III ne serait pas totale dans la souche *maf1Δ*.



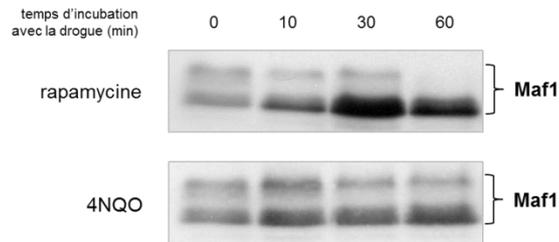
**Figure 25. Marquage des ARN néosynthétisés dans les souches délétées pour le gène *SUB1* et/ou *MAF1* au cours d'un traitement à la rapamycine ou au 4NQO**

Les quatre souches sauvage (YPH500), *sub1Δ*, *maf1Δ* et *sub1Δ maf1Δ* ont été incubées avec de la rapamycine (0,4 mg/mL) ou au 4NQO (0,1 µg/mL). Pour chaque souche, des cellules ont été prélevées avant l'ajout de la drogue (temps 0), après 20 min et après 40 min de traitement, puis ont été incubées en présence d'uracile tritié pendant 10 min. Les ARN ont ensuite été extraits et déposés (à ARN constant) sur un gel d'acrylamide dénaturant pour migration électrophorétique. Le gel contenant les ARN marqués a été exposé contre un film autoradiographique dont la révélation correspond aux signaux présentés. Les ARNt et l'ARNr 5S sont indiqués par des flèches.

Finalement, ces marquages *in vivo* des ARN néosynthétisés nous indiquent que Sub1 et Maf1 seraient impliqués dans la régulation de la transcription par l'ARN Pol III en conditions de stress sans pour autant pouvoir en donner précisément les mécanismes. Ces résultats nous indiquent en plus qu'en présence de 4NQO, la répression a lieu *via* un autre mode d'action n'incluant pas Maf1.

### 3.2.3 Immunodétection des protéines Sub1 et Maf1 dans des cellules traitées au 4NQO ou à la rapamycine

Les protéines Sub1 et Maf1 ont été détectées par immunodétection (*western-blot*) dans des extraits protéiques issus de cellules de la souche sauvage traitées à la rapamycine ou au 4NQO.



**Figure 26. Immunodétection de Maf1 dans la souche sauvage traitée à la rapamycine ou au 4NQO**

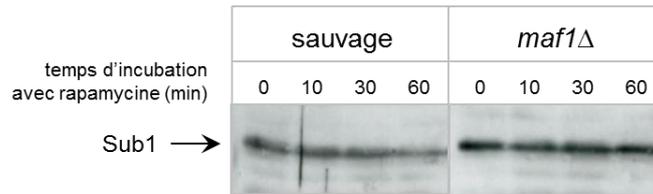
Des extraits protéiques (20 µg) issus d'une culture de *S. cerevisiae* YPH500 traitée 1h à la rapamycine (0,4 mg/mL) ou au 4NQO (1 µg/mL) ont été déposés sur gel d'acrylamide pour migration électrophorétique puis transférés sur membrane de nitrocellulose. La membrane a été incubée avec l'anticorps anti-Maf1. Les bandes présentées sont celles correspondant aux différentes formes de Maf1. Les bandes les plus basses correspondent aux formes les plus déphosphorylées de Maf1.

Concernant Sub1, aucune forme différente de la protéine n'a été identifiée dans nos conditions expérimentales (données non montrées) : la protéine est détectée en même quantité et au même poids moléculaire apparent en rapamycine ou en 4NQO qu'en conditions standard de croissance.

La protéine Maf1 est présente sous plusieurs formes, avec des niveaux de phosphorylation distincts (figure 26). En absence de drogue, on observe principalement deux états de phosphorylation de Maf1, en quantité équivalente. Après 1h de traitement à la rapamycine, Maf1 n'est plus qu'essentiellement représenté sous sa forme déphosphorylée, comme il l'avait déjà été montré (Oficjalska-Pham et al., 2006). De même, en phase stationnaire de croissance, Maf1 est déphosphorylé (donnée non montrée). Par contre, en 4NQO, on n'observe pas de déphosphorylation notable de la protéine Maf1, même après 1h de traitement. Ce résultat indique que le répresseur Maf1 n'est pas ou peu modifié après un traitement au 4NQO, en accord avec les résultats de marquage *in vivo* qui suggèrent que Maf1 n'est pas impliqué dans la répression de la transcription des ARNt dans cette condition.

Comme Maf1 ne semble pas impliqué dans la réponse au 4NQO et qu'aucune variation de la protéine Sub1 n'est détecté dans cette même condition, nous nous sommes par la suite attardés sur l'effet de la rapamycine seulement. Dans cette condition où nous avons vu que Maf1 régule la transcription par l'ARN Pol III, nous avons observé les protéines dans les souches délétées pour l'un ou l'autre des deux gènes *SUB1* et *MAF1*.

Lorsque les souches sont traitées à la rapamycine, Maf1 est progressivement déphosphorylé de la même manière dans *sub1Δ* que dans la souche sauvage. Et dans la souche *maf1Δ*, aucune modification de Sub1 n'est observée, comme dans la souche sauvage.



**Figure 27. Immunodétection de Sub1 dans les souches sauvage et délétée pour *MAF1* au cours d'un traitement à la rapamycine**

La souche sauvage et la souche *maf1Δ* ont été incubées avec de la rapamycine (0,4 mg/mL). Des cellules ont été prélevées avant ajout de rapamycine (temps 0), puis après 10 min, 30 min, et 60 min après ajout. Les extraits protéiques (20 µg) de chaque prélèvement ont été déposés sur gel d'acrylamide pour migration électrophorétique puis transférés sur membrane de nitrocellulose. La membrane a été incubée avec l'anticorps primaire anti-Sub1.

Ces observations n'excluent cependant pas que Sub1 puisse être modifié au cours d'un stress pour moduler son activité régulatrice. D'autres approches expérimentales plus résolutive, telles que des gels 2D ou la spectroscopie de masse, seraient nécessaires pour caractériser de manière plus précise les éventuelles modifications de Sub1.

### 3.2.4 Localisation cellulaire des protéines Sub1 et Maf1

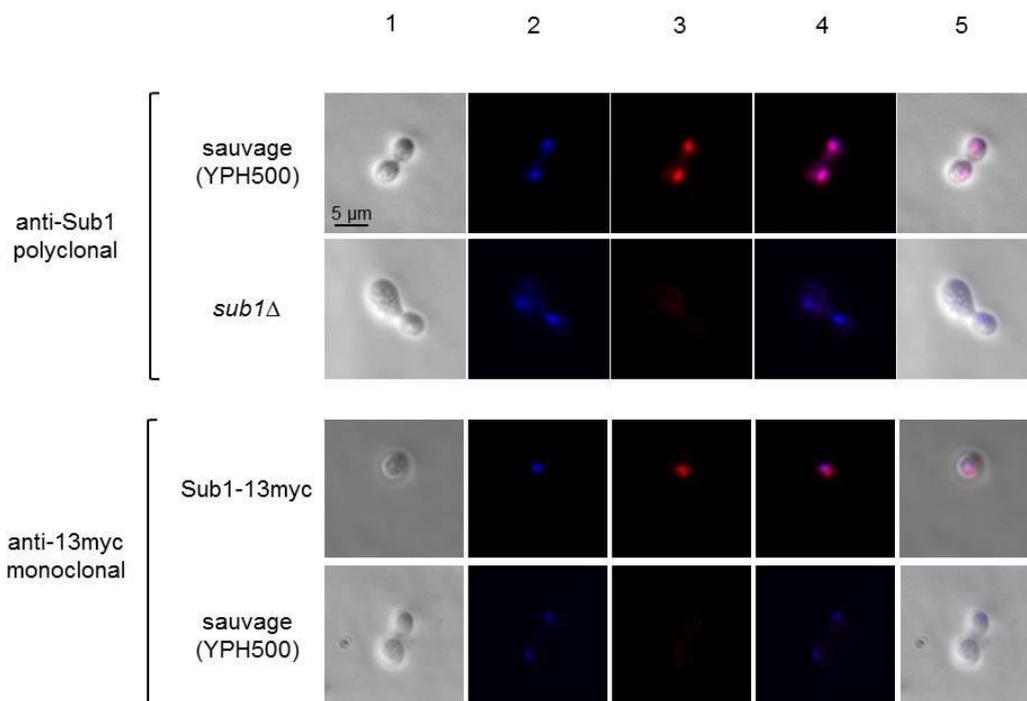
Dans notre étude des relations existant entre les protéines Sub1 et Maf1, respectivement activateur et répresseur de la transcription par l'ARN Pol III, nous nous sommes intéressés à la comparaison de leur localisation cellulaire. En effet, en conditions standards de croissance, le répresseur Maf1 est majoritairement cytoplasmique, sous sa forme phosphorylée. Par contre, en conditions de stress, notamment en phase stationnaire de croissance ou en présence de rapamycine, Maf1 est déphosphorylé et importé au noyau. Qu'en est-il de la protéine Sub1 ? La fonction régulatrice de Sub1 est-elle corrélée à sa localisation, comme c'est le cas pour Maf1 ? La localisation de Sub1 est-elle comparable ou bien distincte de celle de Maf1, bien qu'ils soient liés dans certaines conditions comme nous l'avons vu précédemment ?

Afin d'éclaircir ce point, nous avons d'abord étudié la localisation cellulaire de Sub1. Pour cela, nous avons eu recours à la microscopie à fluorescence dans des cellules de levure *Saccharomyces cerevisiae*. La localisation de Sub1 a d'abord été observée en phase exponentielle de croissance. Ensuite, nous nous sommes intéressés à la localisation de Sub1 et de Maf1 en conditions de stress : en 4NQO et en rapamycine, les deux drogues utilisées dans les expériences précédentes, mais également en phase stationnaire de croissance.

Préalablement à nos expériences, nous avons vérifié que les souches mutantes utilisées avaient une croissance similaire à celle de la souche sauvage (données non montrées).

### 3.2.4.1 Localisation de Sub1 : la protéine est nucléaire et nucléolaire

Nous avons réalisé des immunofluorescences sur des levures fixées au formaldéhyde en phase exponentielle de croissance (figure 28) : dans une souche sauvage et dans une souche Sub1-13myc, la localisation de Sub1 est révélée grâce à des anticorps primaires dirigés respectivement contre la protéine Sub1 et contre l'épitope 13myc étiqueté à Sub1. Nous avons également utilisé une souche exprimant la *Green Fluorescent Protein* (GFP) étiquetée à Sub1 (souche d'INVITROGEN) pour avoir accès *in vivo* à la localisation de Sub1 (donnée non montrée). Dans ces trois souches, le signal correspondant à Sub1, ponctuel, semble nucléaire. La coloration au DAPI, marquant l'ADN nucléaire, nous a permis de confirmer cette hypothèse : les immunofluorescences indiquent que le signal de Sub1 est superposable au signal donné par le DAPI. Ce résultat est cohérent avec la fonction de régulateur transcriptionnel de Sub1: le noyau est le siège des transcriptions, où Sub1 peut interagir avec les machineries de transcription par l'ARN Pol II et III ou avec l'ADN lui-même.

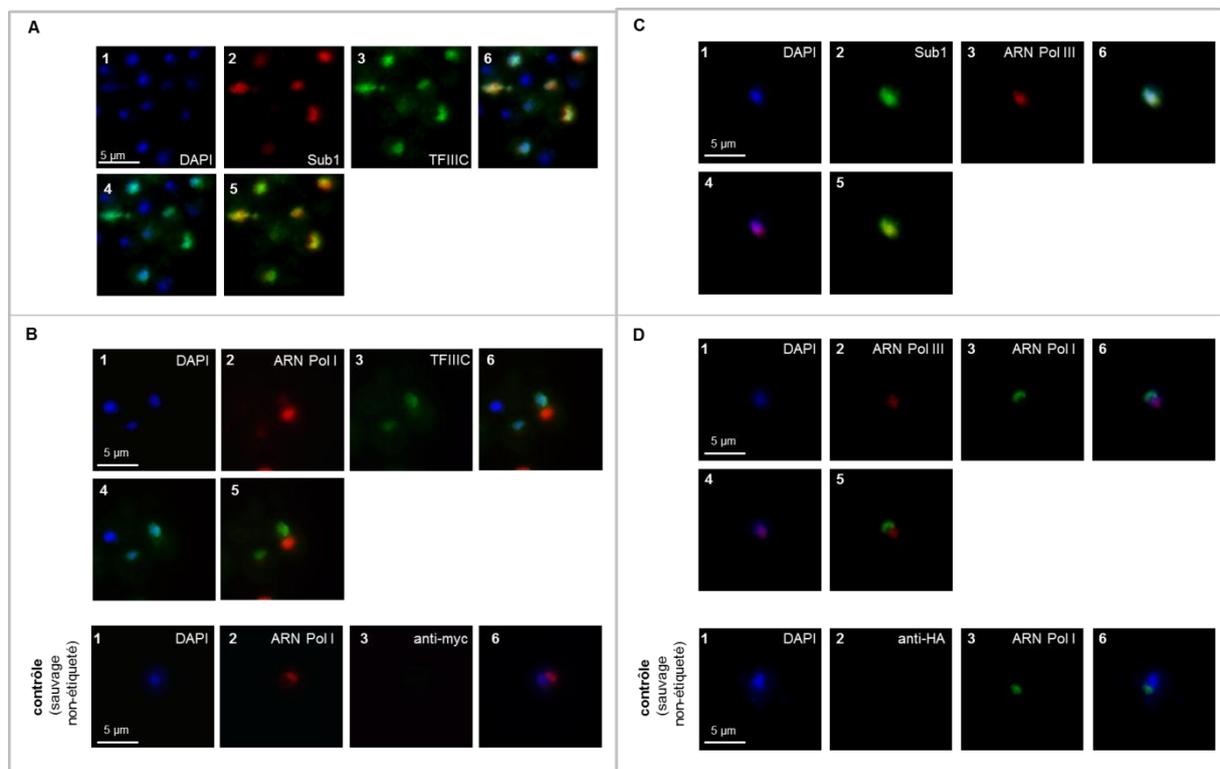


**Figure 28. Localisation cellulaire de Sub1 par immunofluorescence, dans des cellules en phase exponentielle de croissance**

Des cellules des souches de *S. cerevisiae* sauvage (YPH500), *sub1*Δ et exprimant Sub1-13myc ont été récoltées en phase exponentielle et incubées avec l'anticorps polyclonal dirigé contre Sub1 (1/500) ou avec l'anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope 13myc étiqueté à Sub1 (1/500). 1 : cellules en contraste de phase ; 2 : ADN marqué au DAPI ; 3 : Sub1 ; 4 : superposition des signaux DAPI (2) et Sub1 (3) ; 5 : superposition de toutes les images précédentes.

Considérant la fonction de régulateur de la transcription par l'ARN Pol III de Sub1, nous avons analysé sa localisation cellulaire simultanément avec celle de l'ARN Pol III et du facteur TFIIC avec lesquels nous avons montré qu'il interagit. Des immunofluorescences ont été réalisées dans les souches

C160-HA et  $\tau 95$ -myc, où respectivement la sous-unité C160 de l'ARN Pol III a été étiquetée à trois épitopes HA et la sous-unité  $\tau 95$  a été étiquetée à 13 épitopes myc. Dans ces souches, il nous est donc possible de détecter à la fois Sub1 et l'ARN Pol III ou bien Sub1 et TFIIC (figure 29, cadres A et C). Les signaux de l'ARN Pol III et TFIIC sont superposables à ceux de Sub1 et du DAPI : ces composants de la machinerie de transcription sont également nucléaires.



**Figure 29. Localisation de l'ARN Pol III et de TFIIC parallèlement à Sub1 et à l'ARN Pol I, dans des cellules en phase exponentielle de croissance**

Des cellules de levure de *S. cerevisiae* exprimant C160-HA ou  $\tau 95$ -myc en phase exponentielle de croissance ont été incubées avec l'anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope HA ou myc, et avec soit l'anticorps polyclonal anti-Sub1 (cadres A et C), soit avec l'anticorps polyclonal dirigé contre la sous-unité A190 de l'ARN Pol I située au nucléole (cadre B et D).

En haut (A), 1 : ADN marqué au DAPI ; 2 : Sub1 ; 3 : C160 (ARN Pol III) ; 4 : superposition de (1) et (2) ; 5 : superposition de (2) et (3) ; 6 : superposition des images précédentes.

En bas (B), 1 : ADN marqué au DAPI ; 2 : C160 (ARN Pol III) ; 3 : A190 (ARN Pol I) ; 4 : superposition (1) et (2) ; 5 : superposition (2) et (3) ; 6 : superposition des images précédentes. La souche sauvage a également été incubée dans les mêmes conditions en contrôle.

En haut (C), 1 : ADN marqué au DAPI ; 2 : Sub1 ; 3 :  $\tau 95$  (TFIIC) ; 4 : superposition du DAPI (1) et de  $\tau 95$  (TFIIC) (2) ; 5 : superposition de Sub1 (2) et de  $\tau 95$  (TFIIC) (3) ; 6 : superposition des images précédentes.

En bas (D), 1 : ADN marqué au DAPI ; 2 : A190 (ARN Pol I) ; 3 :  $\tau 95$  (TFIIC) ; 4 : superposition du DAPI (1) et de  $\tau 95$  (TFIIC) (2) ; 5 : superposition de  $\tau 95$  (TFIIC) (2) et d'A190 (ARN Pol I) (3) ; 6 : superposition des images précédentes. La souche sauvage a également été incubée dans les mêmes conditions en contrôle.

Remarquablement, au cours de ces expériences d'immunofluorescence, nous avons constaté que le signal de Sub1 était également détecté légèrement en dehors du signal du DAPI, et du signal de l'ARN Pol III. On sait que le noyau n'est pas entièrement coloré par le DAPI : le colorant marque efficacement le nucléoplasme du noyau mais pas le nucléole, zone principalement décrite comme étant le siège de la biogenèse des ribosomes. La protéine Sub1 pourrait se situer non seulement au nucléoplasme mais également au nucléole du noyau. Dans l'optique de vérifier cette hypothèse, un marquage spécifique du nucléole a été réalisé. L'ARN Pol I étant exclusivement nucléolaire (pour articles récents, Trumtel et al., 2000 ; Andersen et al., 2005), nous avons utilisé des anticorps dirigés contre sa sous-unité A190 pour détecter la position du nucléole. Des immunofluorescences réalisées dans la souche Sub1-13myc avec des anticorps anti-A190 et anti-myc permettent la détection à la fois de Sub1 et du nucléole, en plus de la coloration nucléoplasmique au DAPI (figure 30). En parallèle, dans une souche exprimant C160-HA ou bien  $\tau$ 95-myc, nous avons détecté à la fois l'ARN Pol III ou le facteur TFIIC et le nucléole (figure 29, cadres B et D). Le signal donné par la sous-unité A190, marquant le nucléole, est caractérisé par sa forme en croissant qui est adjacente au signal donné par le DAPI. La superposition des signaux correspondant au nucléoplasme (DAPI), au nucléole (ARN Pol I) et à Sub1 ou bien à l'ARN Pol III ou à TFIIC montre que Sub1 est présent à la fois au nucléoplasme et au nucléole dans la majorité des cellules, mais que l'ARN Pol III et TFIIC ne sont détectés qu'au nucléoplasme seulement.

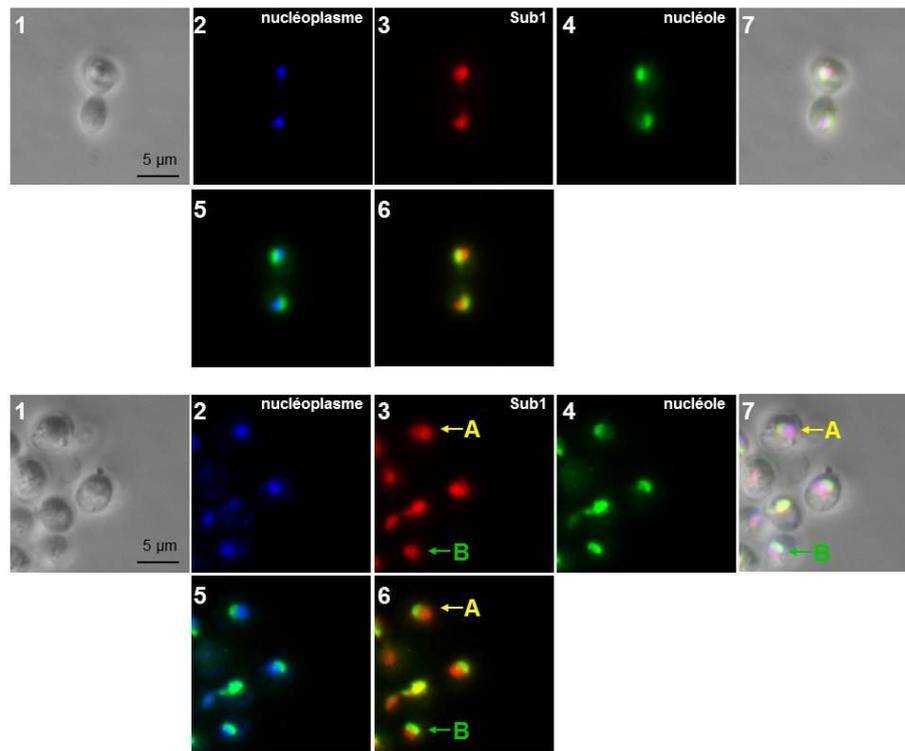
Comme le signal de Sub1 n'apparaissait pas systématiquement et pas toujours de même intensité au nucléole, les cellules observées ont été classées en fonction de l'intensité ( $I_{no}$ ) du signal de Sub1 présent au nucléole, par rapport au maximum d'intensité ( $I_{max}$ ) du signal de Sub1 pouvant être détecté dans la cellule. Arbitrairement, trois classes de cellules ont été établies sur la base d'un échantillon de 50 cellules :

- 55 % des cellules marquées ont leur intensité nucléolaire  $I_{no}$  comprise entre  $0,5 \cdot I_{max}$  et  $I_{max}$  (par exemple, sur la figure 30, cellule A en jaune),
- 33 % des cellules marquées ont  $I_{no}$  compris entre  $0,1 \cdot I_{max}$  et  $0,5 \cdot I_{max}$ ,
- 12 % des cellules marquées ont  $I_{no}$  compris entre 0 et  $0,1 \cdot I_{max}$  (par exemple, sur la figure 30, cellule B en vert).

Ainsi, de façon remarquable, Sub1 apparaît toujours localisé dans le nucléoplasme mais également présent au nucléole dans plus de 80 % des cellules (considérant les deux premières classes de cellules).

Cette localisation nucléolaire de Sub1 est-elle corrélée à sa fonction de régulateur de la transcription Pol III ? On sait que chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, on compte 275 gènes d'ARNt (redondants) qui sont dispersés dans tout le génome, mais transcrits en foyers à proximité du nucléole (Thompson et al., 2003 ; Haeusler et Engelke 2006 ; Haeusler et al., 2008). Or Sub1 semble détecté de manière homogène sur le nucléole et non en foyers à proximité. La transcription seule des gènes d'ARNt ne semble donc pas pouvoir expliquer le signal nucléolaire de Sub1. Le gène *RDN5* de l'ARNr 5S, transcrit par l'ARN Pol III, est présent en 100 à 200 copies au sein des répétitions d'ADNr qui sont localisées physiquement au nucléole et transcrites par l'ARN Pol I. La transcription de cet ARNr 5S situé aux ADNr est-elle suffisante pour expliquer la présence de Sub1 au nucléole ? Ou bien existe-t-il une autre fonction de Sub1 qui puisse expliquer cette localisation nucléolaire ? En effet, Sub1 a plusieurs fonctions au sein de la cellule et sa fonction de régulateur de la transcription par l'ARN Pol III n'est que l'une d'entre elles. Et le nucléole, bien qu'étant principalement décrit comme le siège de la biogenèse des ribosomes et de la synthèse des ARNr par l'ARN Pol I, est un sous-compartiment du noyau également associé à plusieurs autres fonctions comme la régulation de la

mitose, la progression dans le cycle cellulaire, la prolifération et la réponse à plusieurs formes de stress (pour revues, Boisvert et al., 2007 ; Boulon et al., 2010).



**Figure 30. Localisation de la protéine Sub1 et de l'ARN Pol I, dans des cellules en phase exponentielle de croissance**

Des cellules de *S. cerevisiae* exprimant Sub1-13myc en phase exponentielle de croissance ont été incubées avec l'anticorps monoclonal (1/500) dirigé contre l'épitope 13myc et avec l'anticorps polyclonal (1/200) dirigé contre la sous-unité A190 de l'ARN polymérase I située au nucléole. En haut, deux cellules où Sub1 est présent au nucléole. En bas, champ de cellules : la flèche jaune (A) indique une cellule où Sub1 est présent au nucléole et la flèche verte (B) indique une cellule où Sub1 semble absent du nucléole. 1 : cellules en contraste de phase ; 2 : ADN marqué au DAPI ; 3 : Sub1 ; 4 : ARN Pol I ; 5 : superposition du DAPI (2) et d'A190 (ARN Pol I) (4) ; 6 : superposition de Sub1 (3) et d'A190 (ARN Pol I) (4) ; 7 : superposition des images précédentes.

Par ailleurs, pourquoi Sub1 n'est pas détecté au nucléole dans toute la population de cellules ? Il y a seulement environ 10 % des cellules marquées par Sub1 où Sub1 n'est pas au nucléole. Cette répartition est-elle liée à une régulation de la protéine Sub1 d'un sous-compartiment nucléaire à un autre ? On connaît des cas de régulation par la localisation nucléolaire. Par exemple, le *silencing* (inhibition de l'expression) de gènes peut être médié par leur localisation nucléolaire : des gènes sont réprimés s'ils sont à proximité de gènes d'ARNt qui sont regroupés physiquement au nucléole (Wang et al., 2005). Un autre exemple de régulation par la localisation nucléolaire est la régulation du cycle cellulaire reliée à la séquestration de la phosphatase Cdc14p au nucléole : lorsque la phosphatase est relâchée du nucléole, elle impose l'ordre de déphosphorylation des complexes cycline-kinase qui amène à la sortie de la mitose (Manzoni et al., 2010).

Peut-on alors envisager que Sub1 soit lui aussi lié à une régulation par sa localisation nucléolaire ? Par la suite, nous nous sommes intéressés à la localisation des deux régulateurs Sub1 et Maf1 de la transcription par l'ARN Pol III dans des conditions de régulation.

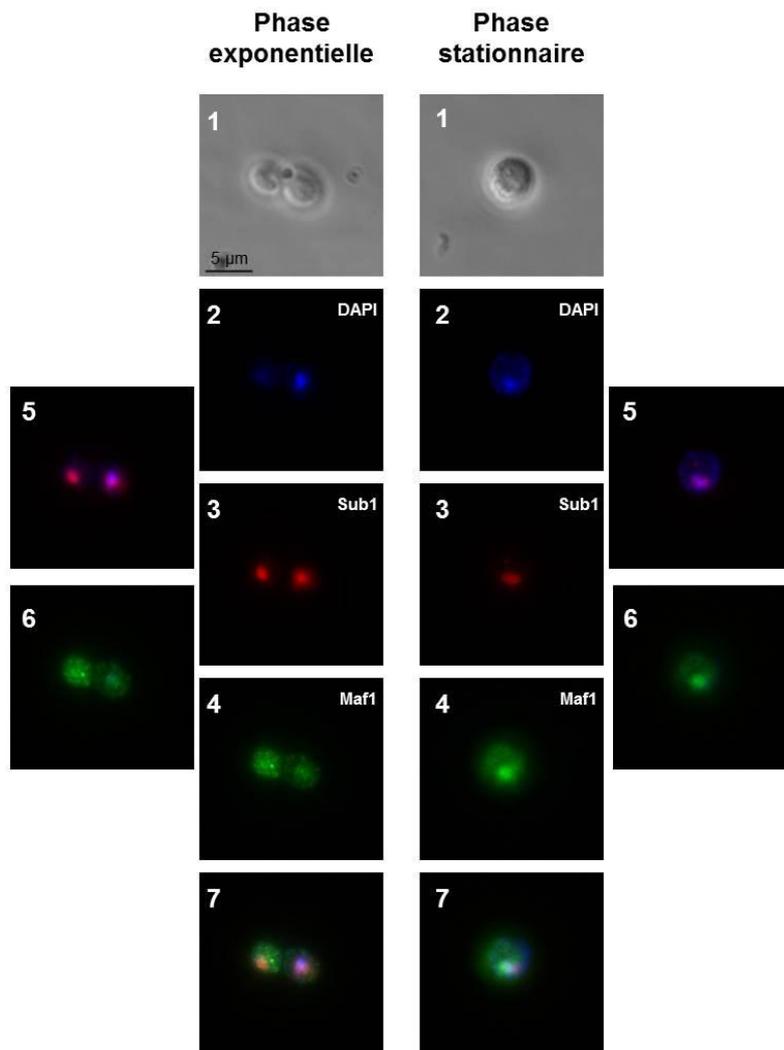
### 3.2.4.2 Localisation cellulaire de Sub1 et de Maf1 en conditions de stress

Nous souhaitons comparer la localisation cellulaire de Sub1 par rapport à celle de Maf1, notamment en phase stationnaire de croissance et lors d'un traitement à la rapamycine, où les deux régulateurs modulent la transcription par l'ARN Pol III. Nous nous sommes également intéressés à la localisation de Sub1 par rapport au nucléole en fonction de ces mêmes stress : la localisation nucléolaire de la protéine peut-elle varier ?

En absence de stress, la protéine Maf1 est majoritairement cytoplasmique. Et lorsque les cellules sont soumises à un stress comme la rapamycine ou en phase stationnaire de croissance, Maf1 se relocalise au noyau (Oficjalska-Pham et al., 2006 ; Roberts et al., 2006). Dans notre étude, des immunofluorescences ont été réalisées non seulement dans ces deux conditions mais aussi en 4NQO (figure 31 et données non montrées). Nous espérons déterminer si la localisation de Sub1 change, comme celle de Maf1, en réponse à l'un des stress et mieux comprendre la relation entre les deux protéines lors de ces stress.

Lors du traitement au 4NQO, Maf1 ne semble pas être relocalisé au noyau (donnée non montrée). Cette observation est en accord avec les marquages *in vivo* et les *western-blots* qui suggèrent que Maf1 n'est pas impliqué dans la répression transcriptionnelle en réponse au 4NQO.

Le signal de Sub1 reste localisé au noyau, que la cellule soit stressée ou non : le même signal superposable au DAPI est retrouvé après l'ajout de rapamycine ou de 4NQO et en phase stationnaire de croissance (figures 31 et 32). Peut-on envisager que le signal de la protéine Sub1 soit différent pendant un laps de temps très court après l'ajout des drogues, et que ce signal redevienne nucléaire au bout d'une heure de traitement, comme c'est le cas pour PC4 après un dommage de l'ADN ? En effet, suite à un traitement au peroxyde d'hydrogène ou à l'HU, PC4 est rapidement et transitoirement recruté aux sites d'ADN endommagé (Mortusewicz et al., 2008). Pour essayer de répondre à cette question, nous avons comparé les signaux de Maf1 et Sub1 après 10 min et après 30 min de traitement (données non montrées). Cette expérience ne présente aucune différence entre les deux temps observés : Sub1 semble invariablement nucléaire tandis que Maf1 est concentré au noyau en présence de rapamycine. Les limitations techniques de cette expérience (petite taille des cellules, cellules observées fixées) ne nous permettent toutefois pas d'exclure complètement l'hypothèse que Sub1 puisse être relocalisé rapidement et transitoirement en foyers suite au stress.



**Figure 31. Localisation cellulaire de Sub1 et Maf1 en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance**

Des cellules de levure de *S. cerevisiae* exprimant Sub1-13myc en phase exponentielle (à gauche) et en phase stationnaire de croissance (à droite) ont été incubées avec l'anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope 13myc de la protéine Sub1 et avec l'anticorps polyclonal anti-Maf1. 1 : contraste de phase ; 2 : ADN marqué au DAPI ; 3 : Sub1 ; 4 : Maf1 ; 5 : superposition DAPI (1) et Sub1 (2) ; 6 : superposition DAPI (1) et Maf1 (3) ; 7 : superposition des trois signaux de fluorescence (2), (3) et (4).

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la localisation nucléolaire de Sub1 : peut-on observer une variation pertinente de cette localisation nucléolaire dans des cellules soumises à un stress, comme c'est le cas pour plusieurs protéines dont la fonction est régulée par rapport à leur présence au nucléole (pour revues, Carmo-Fonseca et al., 2000 ; Boisvert et al., 2007 ; Andersen et al., 2005) ?

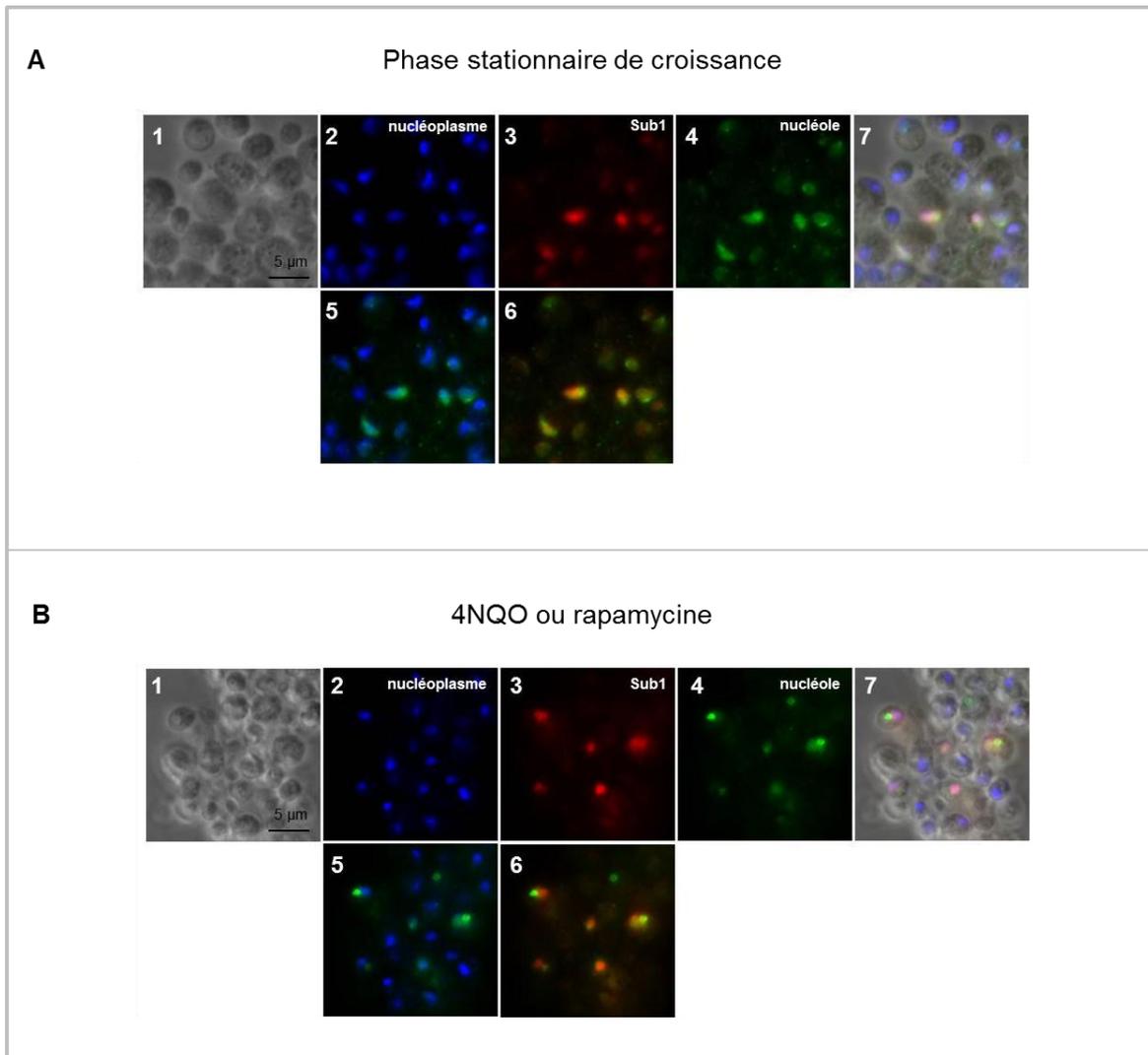
Dans cette optique, des immunofluorescences nous permettant de détecter à la fois Sub1 et le nucléole, *via* la sous-unité A190 de l'ARN Pol I, ont été réalisés sur des cellules traitées au 4NQO, à la rapamycine et dans des cellules en phase stationnaire de croissance. Ces trois conditions présentent des résultats similaires.

On notera dans les images obtenues que les cellules marquées au DAPI sont plus nombreuses que celles marquées par les protéines étudiées. La réalisation des immunofluorescences est moins aisée en conditions de stress qu'en phase exponentielle de croissance : les cellules de levure présentent une paroi plus épaisse, rendant l'étape de sphéroplastisation moins efficace. Les cellules sont donc moins perméables aux anticorps tandis que la molécule de DAPI, de petite taille, s'incorpore sans difficulté quasiment systématiquement dans les cellules.

Le signal de fluorescence détecté pour l'ARN Pol I n'est plus le signal ponctuel (ou en forme de croissant) situé en périphérie du nucléoplasme (marqué par le DAPI) comme il apparaît en phase exponentielle de croissance (figure 29 et 30). En phase stationnaire de croissance (figure 32, panneau A), le signal détecté pour l'ARN Pol I correspond à un signal diffus : le signal est plus intense à une zone située en périphérie du nucléoplasme et se diffuse dans le nucléoplasme. En 4NQO et en rapamycine (figure 32, panneau B), ce signal se présente sous la forme d'un point plus intense qu'en phase stationnaire, également situé en périphérie du nucléoplasme, et qui se diffuse moins dans le nucléoplasme que dans des cellules en phase stationnaire. Ces différentes formes du nucléole témoignent de sa déstructuration, comme dans l'étude de Qiu et al., 2008. Dans les trois conditions testées, le nucléole est donc désorganisé. Ces signaux positionnant l'ARN Pol I nous permettent tout de même de situer le nucléole, malgré sa déstructuration, par rapport au nucléoplasme.

Les images obtenues nous indiquent que Sub1 est toujours nucléaire. Ensuite, par la superposition du signal de Sub1 et de celui du nucléole, on constate que la protéine Sub1 ne semble pas détectée dans la partie la plus intense du nucléole désorganisé, pour les trois conditions testées. Sub1 disparaîtrait-il du nucléole pour ne se retrouver qu'au nucléoplasme ? Malheureusement, les images que nous avons obtenues ne nous permettent pas de visualiser finement les signaux de fluorescence : les signaux nébuleux peuvent être dus à une mise au point limitée qui ne couvre pas toute la profondeur de la cellule. L'utilisation d'un microscope confocal pourrait nous permettre de nous affranchir de cet artefact technique, en ne ciblant qu'un plan horizontal restreint et non toute la profondeur de la cellule. Nous pourrions ainsi vérifier si Sub1 disparaît du nucléole (de la partie intense et/ou de la traînée nucléoplasmique).

En perspective, la localisation nucléolaire de Sub1 dans une souche délétée pour le répresseur Maf1 pourrait être étudiée : l'absence du répresseur modifie-t-elle la localisation de l'activateur ? A l'inverse, la délétion de Sub1 peut-elle influencer la localisation de Maf1 : par exemple, Maf1 serait-il plus présent au noyau ?



**Figure 32. Localisation cellulaire de Sub1 et de l'ARN Pol I en conditions de stress**

Des cellules de *S. cerevisiae* exprimant Sub1-13myc en phase stationnaire de croissance (panneau A) ou dans des cellules traitées au 4NQO (1 µg/mL) ou à la rapamycine (0.4 mg/mL) (panneau B) ont été incubées avec l'anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope myc de Sub1 et avec l'anticorps polyclonal dirigé contre la sous-unité A190 de l'ARN Pol I située au nucléole. 1 : cellules en contraste de phase ; 2 : ADN marqué au DAPI ; 3 : Sub1 ; 4 : ARN Pol I ; 5 : superposition DAPI (2) et ARN Pol I (4) ; 6 : superposition Sub1 (3) et ARN Pol I (4) ; 7 : superposition des images précédentes.

### 3.2.5 Conclusion de l'étude de la fonction de Sub1 par rapport à Maf1

Dans cette partie de l'étude de Sub1 par rapport au répresseur Maf1, nous avons réalisé plusieurs expériences différentes avec les souches délétées pour *SUB1* et/ou *MAF1*. De premiers tests de croissance de ces souches nous indiquent que selon les conditions de stress, Maf1 et Sub1 peuvent être impliqués différemment. Cependant, ces tests de croissance ne nous permettent pas

d'attribuer les phénotypes observés directement à un effet sur la transcription par l'ARN Pol III. C'est pourquoi nous nous sommes ensuite tournés vers des expériences de *northern-blot* et de marquage des ARN *in vivo*, afin d'examiner les ARN transcrits par l'ARN Pol III. En fonction des délétions et des stress appliqués, nous avons pu observer que Maf1 intervient dans la répression de la transcription par l'ARN Pol III en rapamycine mais pas en réponse au 4NQO. De son côté, les mêmes expériences nous indiquent que l'absence de Sub1 conduit à une transcription par l'ARN Pol III encore plus faible en conditions de stress. Par la suite, des *western-blots* réalisés pour Sub1 et Maf1 ne nous pas permis de mettre en évidence de lien entre les deux régulateurs. Enfin, nous avons cherché à comparer la localisation cellulaire de Sub1 et Maf1 en conditions de stress, sachant que la localisation de Maf1 pouvait être corrélée à la répression de la transcription par l'ARN Pol III lorsque les cellules entrent en phase stationnaire ou lorsqu'elles sont traitées à la rapamycine. Il a alors été observé que la localisation cellulaire de Maf1 ne variait pas suite à un stress au 4NQO, en accord avec nos résultats de marquage *in vivo* des ARN et nos *western-blots* qui montrent que Maf1 n'est pas le médiateur de la répression transcriptionnelle dans cette condition. Nous avons également pu déterminer que Sub1 est une protéine nucléaire mais nous n'avons pas observé de variation de sa localisation nucléaire en fonction des stress étudiés. Nous avons montré que Sub1 était détecté dans le sous-compartiment qu'est le nucléole.

En conclusion, à travers ces expériences, nous n'avons malheureusement pas pu mettre en évidence de lien clair entre l'activateur Sub1 et le répresseur Maf1 de la transcription par l'ARN Pol III. Dans les conditions testées, les deux régulateurs semblent moduler la transcription par l'ARN Pol III de manière complexe. D'autres régulateurs interviendraient également pour réguler cette transcription en fonction de stress et restent à être identifiés.

### 3.3 Construction de double délétants et tests de croissance

Toujours dans l'optique de repositionner les fonctions de la protéine Sub1 au cœur des voies métaboliques de la cellule, nous avons décidé d'étudier les liens fonctionnels éventuels de Sub1 avec d'autres familles de gènes. Nous avons étudié les effets phénotypiques de la délétion de *SUB1* (pour rappel, non essentiel) dans des souches déjà délétées pour un gène dont les fonctions sont déjà caractérisées. Dans cette stratégie, les mutants sont étudiés non seulement en conditions standard de croissance mais aussi en conditions de stress.

Nous nous sommes appuyés sur la base de données BioGRID (*biological general repository for interaction datasets*, Stark et al., 2006) qui recense les interactions génétiques ou protéiques de Sub1 (répertoriés en annexe). Une trentaine de gènes intervenant dans différentes fonctions cellulaires ont été sélectionnés dans cette liste, auxquels nous avons par la suite ajouté une dizaine d'autres gènes impliqués dans les mêmes fonctions que les candidats choisis (cf. annexe). Nous avons par exemple ajouté des gènes intervenant dans la modification de la chromatine. En effet, parmi les partenaires potentiels présentés par BioGRID, on retrouve notamment des protéines du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Swi3, Swi4, Snf4), du complexe SET3C de déacétylation d'histone Set3, Hos2, Hst1, Sif2 et Snt1), ainsi que des protéines du complexe SAGA d'acétylation (Gcn5). Nous avons alors complété notre liste de gènes candidats avec d'autres protéines du complexe SET3C (Hos4), d'autres complexes de déacétylation (Hda1, Elp3, Rpd3, Sir2) ou d'acétylation (Rtt109).

Pour réaliser la double délétion de *SUB1* avec un autre gène, nous avons utilisé des souches déjà délétées qui proviennent de la banque EUROFAN II (d'EUROSCARF). Les double délétants résultent donc de la transformation, dans ces mutants de la banque, par une cassette de délétion propre à *SUB1* construite par PCR selon la méthode de Longtine et al., 1998 (procédure décrite en 5.2.1). Au préalable, les simple délétions des mutants de la banque EUROFAN II ont été vérifiées par PCR (à l'aide d'une paire d'amorces conçues pour s'hybrider dans le gène supposé délété et d'une paire d'amorces conçues pour s'hybrider en amont et en aval de la délétion, soit de part et d'autre du marqueur de sélection). Après ces séries de vérification, plusieurs souches de la banque ont été rejetées, ramenant alors le nombre de souches déjà délétées pour un des gènes candidats à seulement vingt.

Les transformations de ces vingt mutants, et de la souche sauvage de référence, par la cassette de délétion de *SUB1* n'ont malheureusement pas toutes été concluantes. En effet, de nombreux clones qui ont été récupérés sur le milieu sélectif se sont révélés être de faux positifs de transformation (après vérification de la délétion de *SUB1* par PCR et par *western-blot*). Finalement, le nombre de souches obtenues doublement délétées, pour *SUB1* et pour un autre gène interagissant potentiellement avec notre activateur, s'élève à onze. Le fait de ne pas pouvoir obtenir de double délétion, même après quatre tentatives de transformation par la cassette, nous laisse supposer que certaines double délétions sont peut-être létales. Pour confirmer cette hypothèse, il nous faudrait croiser les simple délétants et analyser la viabilité des spores obtenus ou bien réaliser des constructions de souches où les gènes ne seraient exprimés que conditionnellement.

Nous nous sommes finalement attachés à l'analyse de la croissance des onze double délétants obtenus.

### 3.3.1 Souches construites

La liste des gènes pour lesquels nous avons obtenu des double délétants est donnée dans le tableau suivant. Ils sont regroupés en plusieurs catégories indiquées dans la première colonne à gauche. La description succincte des gènes est tirée de la *Saccharomyces Genome Database*.

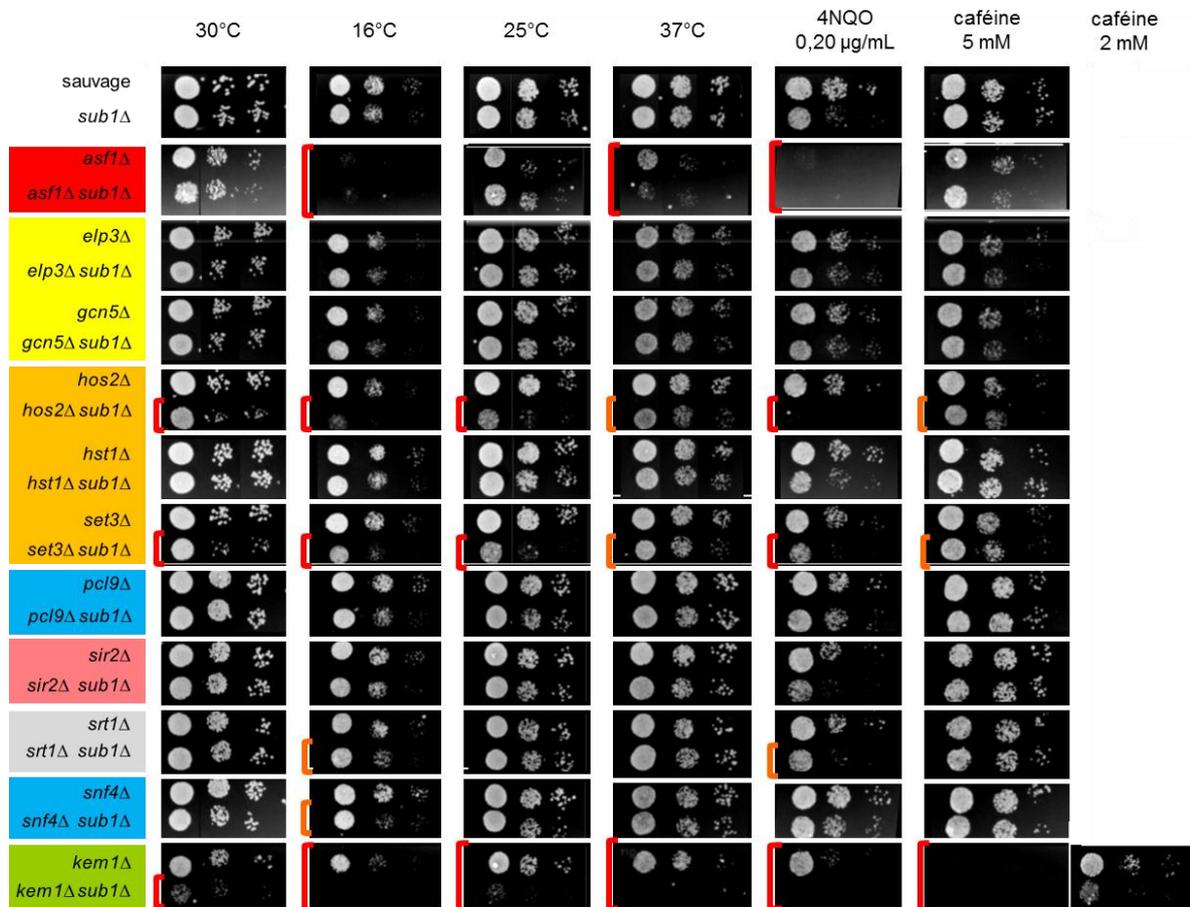
Catégorie	Nomenclature	Gène	Description	Lien avec Sub1
remodelage de la chromatine	YJL115W	ASF1	Nucleosome assembly factor, involved in chromatin assembly and disassembly, anti-silencing protein that causes derepression of silent loci when overrepressed; plays a role in regulating Ty1 transposition	interaction génétique
acétylation des histones	YPL086C	ELP3	Subunit of <b>Elongator complex</b> , which is required for modification of obble nucleosides in tRNA; exhibits histone acetyltransferase activity that is directed to histones H3 and H4; disruption confers resistance to <i>K. lactis</i> zymotoxin	
acétylation des histones	YGR252W	GCN5	Acetyltransferase, acetylates N-terminal lysines on histones H2B and H3; acetylates Rsc4p, a subunit of the RSC chromatin-remodeling complex, altering replication stress tolerance; catalytic subunit of the <b>ADA and SAGA histone acetyltransferase complexes</b> ; founding member of the <i>Gcn5p</i> -related N-acetyltransferase superfamily	interaction génétique
déacétylation des histones	YGL194C	HOS2	Histone deacetylase required for gene activation via specific deacetylation of lysines in H3 and H4 histone tails; subunit of the <b>Set3 complex</b> , a meiotic-specific repressor of sporulation specific genes that contains deacetylase activity	interaction génétique
déacétylation des histones	YOL068C	HST1	NAD(+)-dependent histone deacetylase; essential subunit of the <i>Sum1p/Rfm1p/Hst1p</i> complex required for ORC-dependent silencing and mitotic repression; non-essential subunit of the <b>Set3C deacetylase complex</b> ; involved in telomere maintenance	interaction génétique (suppression de phénotype)
déacétylation des histones	YKR029C	SET3	Defining member of the <b>SET3 histone deacetylase complex</b> which is a meiosis-specific repressor of sporulation genes; necessary for efficient transcription by RNAPII; one of two yeast proteins that contains both SET and PHD domains	interaction génétique
déacétylation des histones	YDL042C	SIR2	Conserved NAD+ dependent <b>histone deacetylase</b> of the Sirtuin family involved in regulation of lifespan; plays roles in silencing at HML, HMR, telomeres, and the rDNA locus; negatively regulates initiation of DNA replication	
phosphorylation	YDL179W	PCL9	Cyclin, forms a functional <b>kinase complex</b> with Pho85p cyclin-dependent kinase (Cdk) expressed in late M/early G1 phase, activated by Swi5p	
phosphorylation	YGL115W	SNF4	Activating gamma subunit of the AMP-activated <b>Snf1p kinase complex</b> (contains Snf1p and a Sip1p/Sip2p/Gal83p family member); activates glucose-repressed genes, represses glucose-induced genes; role in sporulation, and in peroxisome biogenesis	interaction génétique
phase stationnaire	YMR101C	SRT1	Cis-phenyltransferase involved in synthesis of long-chain dolichols (19-22 isoprene units; as opposed to <i>Rer2p</i> which synthesizes shorter-chain dolichols); localizes to lipid bodies; transcription is induced in stationary phase	
métabolisme des ARN	YGL173C	KEM1	Evolutionarily-conserved 5'-3' exonuclease component of cytoplasmic processing (P) bodies involved in mRNA decay; plays a role in microtubule-mediated processes, filamentous growth, ribosome RNA maturation and telomere maintenance	interaction génétique

Les double délétants construits sont donc les suivants : *asf1Δ sub1Δ*, *elp3Δ sub1Δ*, *gcn5Δ sub1Δ*, *hos2Δ sub1Δ*, *hst1Δ sub1Δ*, *kem1Δ sub1Δ*, *pcl9Δ sub1Δ*, *set3Δ sub1Δ*, *sir2Δ sub1Δ*, *snf4Δ sub1Δ* et *srt1Δ sub1Δ*, en plus de la souche BY4741 délétée de la même manière (souche *sub1Δ*).

### 3.3.2 Tests de croissance

La croissance des onze double délétants a été étudiée dans différentes conditions de culture et comparée à celle des simple délétants correspondants par des tests de croissance en gouttes (figure 33). Les conditions de culture auxquelles nous nous sommes intéressés sont :

- différentes températures : 16°C, 25°C, 30°C et 37°C,
- en présence de 4NQO, agent mimétique d'un stress au rayonnement UV,
- en présence de caféine, dont les effets pléiotropiques affectent plusieurs fonctions cellulaires.



**Figure 33. Croissance des souches de *S. cerevisiae* délétées pour le gène *SUB1* et pour un deuxième gène**

Trois dilutions de culture ( $DO_{600nm} = 10^{-1}$  ;  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ) de chaque souche ont été déposées en gouttes sur un milieu riche incubé à différentes températures (16°C, 25°C, 30°C et 37°C) ou supplémenté en 4NQO (0,20 µg/mL) ou en caféine (2 et 5 mM). Les délétions sont indiquées à gauche (surlignées avec les mêmes couleurs que dans le tableau en 3.3.1.), les conditions de culture sont indiquées en haut. Le fond génétique des souches est BY4741. Les repères en rouge indiquent les souches double délétantes plus sensibles que la souche *sub1Δ*. Les repères en orange indiquent les souches aussi sensibles que *sub1Δ*.

Tout d'abord, on remarque que la croissance des souches sauvages et *sub1Δ* dans le fond génétique BY4741 diffère légèrement de celles dans le fond génétique YPH500 (cf. 3.2.1.). Les souches dans le fond génétique BY4741 sont plus résistantes que les souches YPH500, dans toutes les conditions testées.

En condition standard de croissance, à 30°C, on observe qu'aucune souche simple mutante n'est affectée. Par contre, parmi les double délétants, on remarque qu'à 30°C les trois souches *hos2Δ sub1Δ*, *set3Δ sub1Δ* et *kem1Δ sub1Δ* ont une croissance affectée (plus sévèrement chez *kem1Δ sub1Δ*) par rapport à la croissance des simple mutants correspondants ou de la souche sauvage. Ces résultats indiquent que *SUB1* et les gènes *HOS2*, *SET3* et *KEM1* sont impliqués dans une voie nécessaire à la croissance cellulaire optimale. On observe également que les trois double délétants présentent une sensibilité accrue dans toutes les autres conditions testées (toujours plus sévère chez *kem1Δ sub1Δ*, même si *kem1Δ* est déjà plus sensible que *sub1Δ*).

Notons que les protéines Hos2, Set3 et Hst1 font partie du complexe SET3C de déacétylation d'histone (Pijnappel et al., 2001). L'effet synthétique des deux délétions de *SUB1* et *HOS2* ou *SET3* nous indique que ces protéines contribuent ensemble à la croissance optimale de la cellule. Par contre, le double délétant *hst1Δ sub1Δ* ne présente que de faibles sensibilités dans quelques conditions testées, intermédiaires à celle de la souche *sub1Δ* et de *hst1Δ*. Hst1, qui est une sous-unité non essentielle du complexe SET3C, ne semble pas intervenir avec Sub1 comme Hos2 et Set3.

Kem1, quant à lui, possède plusieurs fonctions diverses. Définie originellement comme un gène affectant la karyogamie (*Kar 1 nuclear fusion defect enhancing mutation*) (Kim et al., 1990), Kem1 est également présentée comme une exonucléase, sous le nom de Xrn1 (pour exoribonucléase) intervenant dans la dégradation des ARNm et dans la dégradation rapide des ARNt matures (Long et McNally, 2003 ; Chernyakov et al., 2008). *KEM1/XRN1* présente de fortes similarités de séquences avec *XRN2/TAP1* (pour transcription activator protein 1), un gène dont la forme mutée *tap1-1* est capable de compenser le défaut de transcription d'un gène d'ARNt muté (Kenna et al., 1993 ; Di Segni et al., 1993). Kem1 possède-t-il les mêmes propriétés que son paralogue Tap1 ? Dans nos test de croissance, la délétion de *KEM1* n'est pas létale (contrairement à celle de *TAP1*) (Di Segni et al., 1993). Bien que *kem1Δ* soit sensible dans plusieurs conditions testées, le double délétant *kem1Δ sub1Δ* semble encore plus affecté. La protéine Sub1 fonctionnerait-elle alors en parallèle de Kem1 dans une activité commune de régulation de la transcription d'ARNt ?

Un autre double délétant dont la croissance est fortement affectée dans quelques conditions testées est *asf1Δ sub1Δ*. Asf1 (pour anti-silencing function 1) est une chaperonne d'histone impliquée dans le remodelage de la chromatine (pour revue, Mousson et al., 2006). Sa fonction dans la régulation de l'expression de gènes pourrait expliquer la sensibilité de la souche *asf1Δ* à différentes températures. Asf1 est par ailleurs impliqué dans la réponse au dommage à l'ADN (Emili et al., 2001 ; Hu et al., 2001), d'où la sensibilité de la souche *asf1Δ* observée en présence de 4NQO. Par contre, en caféine, la croissance de la souche *asf1Δ sub1Δ* n'apparaît pas plus affectée, ce qui nous conduit à penser que ni Asf1, ni Sub1 ne sont impliqués dans la réponse au stress induit par la caféine. Ces tests de croissance ne nous permettent pas de mettre en évidence un lien clair entre Asf1 et Sub1. De manière intéressante, Asf1 intervient dans la régulation des gènes en modulant l'activité acétyltransférase de Rtt109 (pour article récent, Kolonko et al., 2010). Des expériences préliminaires dans notre laboratoire montrent par des *ChIP* qu'Asf1 et Rtt109 occupent les gènes de classe III (donnée non montrée). D'autres études nous permettront de caractériser le lien entre ces protéines de remodelage de la chromatine et la transcription par l'ARN Pol III.

Pour les autres double mutants, leur sensibilité semble correspondre la plupart du temps à un phénotype intermédiaire à celui des deux simple délétions : les phénotypes attribués à chaque simple délétion s'accumuleraient. Et dans le cas du double délétant *srt1Δ sub1Δ*, la souche présente la même sensibilité que la souche *sub1Δ* en présence de 4NQO : on peut supposer que Sub1, mais pas Srt1, est impliqué dans la réponse au 4NQO. Aucun lien entre ces gènes testés et *SUB1* n'est finalement mis en évidence.

### 3.4 Perspectives à l'étude des double délétants obtenus

L'analyse dans nos tests de la croissance des double délétants obtenus nous a permis d'écarter des interactions recensées dans BioGRID lors d'études globales (cribles génétiques à grande échelle).

L'interprétation de nos résultats se révèle complexe et apporte quelques informations entre Sub1 et d'autres protéines. Les deux protéines Hos2 et Set3, du complexe Set3C de déacétylase d'histone, semblent intervenir parallèlement à Sub1 pour une croissance optimale de la levure dans les conditions que nous avons testées. Il pourrait être intéressant de rechercher un suppresseur du phénotype des double mutants *hos2Δ sub1Δ* et *set3Δ sub1Δ*, qui se situerait en amont de ces gènes et nous permettrait d'identifier la fonction cellulaire affectée par la délétion de ces gènes.

De manière inattendue, ces tests de croissance nous ont conduit à porter une attention particulière à Kem1, qui présente de fortes homologies avec Tap1, une protéine dont une mutation est spécifiquement capable de stimuler la transcription d'un gène d'ARNt modifié. L'absence de Kem1 affecte la croissance de la levure, notamment en présence de caféine, une drogue aux effets pléiotropes. Et la délétion supplémentaire de *SUB1* conduit à une sensibilité fortement aggravée en conditions standard de croissance. Ce phénotype accentué nous suggère que les deux protéines pourraient intervenir dans une fonction essentielle à la croissance de la cellule. Comme Sub1 et Kem1 ont chacun de multiples fonctions au cœur de la cellule, nous ne pouvons pas définir dans quelle voie de régulation les protéines seraient toutes les deux impliquées. Le fait que Sub1 soit un activateur de la transcription par l'ARN Pol III et que Kem1 soit un paralogue de Tap1 nous laisse supposer que la transcription par l'ARN Pol III dans la souche *kem1Δ sub1Δ* pourrait être sévèrement affectée et expliquer le défaut de croissance observé. Mais nous ne pouvons pas exclure que ce phénotype soit dû à défaut dans un autre mécanisme.

Ainsi, dans le cas de *kemΔ* mais également d'autres mutants, il serait intéressant de poursuivre leur étude par d'autres analyses, comme un marquage *in vivo* des ARNt, afin de déterminer si certaines des connections observées avec *sub1* peuvent influencer la transcription par l'ARN Pol III.

---

## Chapitre 4

# Discussion et perspectives

---

Notre laboratoire a longtemps étudié la composition de la machinerie de transcription par l'ARN Pol III, révélant progressivement les pièces du puzzle que constitue cette machinerie. En 2006, la reconstitution *in vitro* d'un système de transcription minimal, avec des sous-unités des facteurs TFIIB et TFIIC toutes recombinantes et avec de l'ARN Pol III hautement purifiée, a représenté une avancée majeure pour la compréhension de l'assemblage de la machinerie de transcription. A partir de ce système reconstitué *in vitro*, il nous a été possible d'observer que ce système minimal n'était pas optimal, comparé à un système de transcription reconstitué avec des fractions purifiées. Alors, comment notre système de transcription peut-il atteindre cet *optimum* ?

Au même moment, une protéine capable de réprimer la transcription par l'ARN Pol III *in vivo* a suscité l'intérêt de plusieurs laboratoires : Maf1 est le premier répresseur de la transcription par l'ARN Pol III identifié vers lequel convergent de nombreuses voies de signalisation en réponse à un stress.

L'idée qu'un activateur puisse exister, en contrepartie de ce répresseur, n'est pas nouvelle. Comme nous l'avons vu en introduction, quelques stimulateurs de la transcription par l'ARN Pol III ont été proposés. Mais l'étude de l'activité stimulatrice de chacun s'avérait complexe. Le fait que nous disposions désormais d'un système de transcription *in vitro* minimal nous a incité à tester l'un de ces candidats. L'étude de la protéine Sub1 en tant qu'activateur de la transcription par l'ARN Pol III chez *Saccharomyces cerevisiae* avait alors démarrée.

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé Sub1 en tant qu'activateur, capable de stimuler l'initiation et la réinitiation de la transcription par l'ARN Pol III. Nous avons également étudié ensemble les deux régulateurs Maf1 et Sub1, l'un répresseur et l'autre activateur. Enfin, nous nous sommes demandés dans quelles conditions l'activateur Sub1 pouvait être sollicité : quel est le rôle de cette protéine non essentielle au sein de la cellule ?

Au-delà des résultats et des premières conclusions et discussions qui ont été présentés dans les chapitres précédents, d'autres questions ont émergées non seulement par rapport à la transcription par l'ARN Pol III et Sub1, mais également par rapport aux régulateurs de la transcription par l'ARN Pol III.

## 4.1 La protéine Sub1, un facteur de transcription complexe

### 4.1.1 Sub1 et la transcription par l'ARN Pol III

Nous avons mis en évidence que Sub1 stimule la transcription par l'ARN Pol III en interagissant avec les facteurs TFIIB et TFIIC. Nous pouvons nous demander quel est précisément le mécanisme d'action de Sub1 *in vivo* : comment Sub1 recrute-t-il ces facteurs ? Quels domaines de chacune des protéines entrent en interaction ? Sous quelles conditions ces interactions sont-elles possibles ?

Sub1 intervient au niveau de l'initiation et de la réinitiation. La protéine peut-elle également intervenir au niveau de l'élongation ou de la terminaison de la transcription par l'ARN Pol III ?

Quelques données suggèrent que Sub1/PC4 participerait à l'élongation de la transcription par l'ARN Pol II, en interagissant génétiquement avec TFIIS et Rpb9 (Koyama et al., 2008) et physiquement avec des kinases et une phosphatase (Calvo et Manley, 2005 ; Garcia et al., 2010) tous impliqués dans l'activité d'élongation de l'ARN Pol II. Peut-on envisager que Sub1 puisse de manière équivalente participer à l'élongation de la transcription par l'ARN Pol III ?

Qu'en est-il de la terminaison ? On sait que PC4 contribue à une terminaison correcte de la transcription du gène *VA1* (Wang et Roeder, 1998). On peut supposer que Sub1 possède la même capacité à conduire à une terminaison précise de la transcription par l'ARN Pol III.

### 4.1.2 Sub1 pourrait-il être impliqué la transcription par l'ARN Pol I ?

Notre étude soulève une autre interrogation : Sub1 pourrait-il également réguler la transcription par l'ARN Pol I de tous les ARNr ?

L'idée que les transcriptions par l'ARN Pol I et III soient coordonnées est soutenue par le fait que les deux transcriptions se déroulent au nucléole chez la levure. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les gènes de classe III sont dispersés à travers tout le génome mais physiquement localisés et transcrits par l'ARN Pol III au nucléole (près ou bien dans le nucléole) (Thompson et al., 2003 ; Haeusler et al., 2006), où sont exclusivement synthétisés les ARNr par l'ARN Pol I. D'ailleurs, ces études émettaient l'hypothèse que les composants de la machinerie de transcription par l'ARN Pol III soient de ce fait également présents au nucléole. Mais nos expériences d'immunofluorescence nous indiquent que l'ARN Pol III et TFIIC ne sont détectés qu'au nucléoplasme. Nous ne pouvons toutefois pas préciser si les composants détectés au nucléoplasme sont assemblés sur des gènes de classe III et en train de transcrire ou bien s'ils sont libres et inactifs. Alors Sub1, que nous avons pu détecter au nucléole, est-il impliqué également impliqué dans la transcription par l'ARN Pol I ? L'occupation par Sub1 du gène de l'ARNr 35S (figure S2 en annexe de l'article) nous le laissait également supposer. Mais des expériences préliminaires d'extension d'amorces ciblant des ARNr transcrits par l'ARN Pol I et de marquage *in vivo* des ARNr néosynthétisés ne nous permettent pas de détecter de variation de leur transcription en l'absence de Sub1. Alors, la structure chromatiniennne du gène de l'ARNr 35S

serait-elle simplement favorable à son occupation par la protéine Sub1 ? Le lien entre Sub1 et la transcription par l'ARN Pol I reste à être éclairci.

Finalement, Sub1 pourrait-il participer aux trois transcriptions par les ARN Pol I, III et III ? De manière intéressante, au cours de notre analyse de l'occupation de Sub1 sur le génome, nous avons pu détecter Sub1 des gènes transcrits par l'ARN Pol II dont la plupart sont importants pour la croissance cellulaire : gènes codant pour des constituants de la paroi cellulaire, gènes d'histones, gènes spécifiant des protéines ribosomiques... Sub1 serait-il un régulateur de la croissance cellulaire, par son implication dans les trois types de transcription ?

### 4.1.3 Quels sont les domaines fonctionnels de Sub1 ?

Quelle partie de Sub1 est nécessaire à sa fonction d'activateur de la transcription par l'ARN Pol III ? Peut-on considérer que les fonctions de Sub1 dans chacune des deux transcriptions par l'ARN Pol II et III nécessitent la même partie de la protéine ? Considérant que PC4 est homologue à la partie N-terminale de Sub1, on peut penser que cette région homologue serait celle qui intervient dans les fonctions d'activateur transcriptionnel. Quelle est alors la fonction de la partie C-terminale de Sub1, qui n'est pas commune à PC4 ?

Sub1 pourrait utiliser des propriétés similaires à celle de PC4 pour stimuler la transcription par l'ARN Pol III. PC4 possède un domaine de liaison à l'ADN (Werten et al., 2006) et son association à la chromatine lui permet de réguler l'expression de gènes (Das et al., 2006 ; Das et al., 2010). Alors, d'un côté, Sub1 pourrait être positionné sur l'ADN et faciliter ainsi le recrutement des facteurs de transcription TFIIC et TFIIB sur la chromatine. D'un autre côté, Sub1 pourrait également faciliter l'accès des gènes de classe III aux composants de la machinerie de transcription en structurant la chromatine, en courbant l'ADN ou en agissant sur son état de condensation, comme il l'est proposé pour PC4.

Une autre question nous interpelle : Sub1, en tant que stimulateur, est-il lui-même régulé ? Pour le moment, nous avons vu que Sub1 était nécessaire à la transcription optimale par l'ARN Pol III en conditions standard de croissance. Nous ne pouvons pas exclure que l'activité de Sub1 soit modulés au cours de la répression de la transcription, comme par exemple en présence de rapamycine ou de 4NQO. La protéine peut-elle être inactivée ? La protéine possède-t-elle des résidus particuliers qui seraient la cible d'une régulation de sa fonction, comme c'est le cas chez PC4 (Kaiser et al., 1995 ; Jonkers et al., 2006a et b) ? Après avoir interrogé quelques bases de données, dont PhosphoGRID et PhosphoPep, il apparaît que Sub1 possède quelques sites de phosphorylation. La protéine pourrait également porter des acétylations sur ses lysines. Mais pour le moment, des expériences préliminaires visant à identifier par RMN des modifications de résidus de la protéine en fonction d'un stress n'ont pas révélé de différence de modification en fonction des conditions de culture.

## 4.2 D'autres conditions de croissance où Sub1 pourrait être essentiel ?

Au cours de notre étude, nous avons testé l'importance de la présence de Sub1 lorsque les cellules sont soumises à divers stress : plusieurs températures, en présence de caféine, d'HU et surtout de rapamycine et de 4NQO.

Parallèlement, considérant que la transcription par l'ARN Pol III diminue lorsque les cellules entrent en phase stationnaire, nous avons comparé l'occupation par Sub1 des LEPTM, contenant les gènes de classe III, en phase exponentielle et en phase stationnaire (figure S3 en annexe de l'article). Bien que Sub1 occupe toujours les LEPTM en phase stationnaire, on observe tout de même une diminution de l'occupation de Sub1 aux gènes de classe III, similaire à celle publiée pour l'ARN Pol III et pour TFIIIB (Oficjalska-Pham et al., 2006). Cette différence de liaison peut-elle expliquer la diminution de l'expression des gènes ? Dans ce cas, y a-t-il une corrélation entre la diminution de la liaison de Sub1 avec celle des autres composants de la machinerie de transcription ? Et quels mécanismes conduisent au départ de Sub1 ? Sachant que Maf1 participe à la répression de la transcription par l'ARN Pol III dans ces conditions, peut-il exister un lien entre l'occupation de Sub1 et l'activité de répresseur de Maf1 ?

D'un autre point de vue, il est également intéressant d'aborder l'étude de notre activateur dans des conditions où il pourrait être sollicité : par exemple lorsque les cellules sortent d'un état de stress. Dans cette optique, nous nous sommes attardés sur la sortie de la phase stationnaire par retour à des conditions de croissance favorables. Dans cette situation, nous avons pu remarquer que des cellules dépourvues de Sub1 reprennent leur rythme de division avec un délai de quelques heures (selon le temps passé en phase stationnaire) par rapport à la souche sauvage, bien qu'elles aient un temps de génération identique. Confortés par l'idée que Sub1 soit nécessaire à la reprise optimale de la croissance des cellules, nous pourrions approfondir l'étude de la fonction de la protéine par rapport aux mécanismes de la sortie de phase stationnaire ou la sortie de stress induits par des drogues.

## 4.3 Considérations sur l'analyse de la transcription par l'ARN Pol III

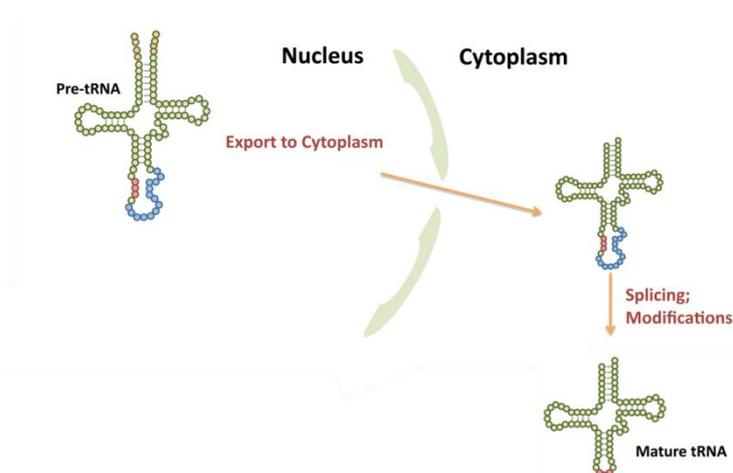
### 4.3.1 Les gènes de classe III sont-ils tous transcrits de manière équivalente ?

Au cours de nos détections d'ARNt par *northern-blot*, nous avons pu remarquer que les ARNt ne se comportaient pas tous de la même manière en réponse à un stress. On remarque également

que les LEPTM ne sont pas tous occupés de manière complètement identique par l'ARN Pol III, TFIIB, TFIIC, ou Sub1 et que lorsque les cellules entrent en phase stationnaire, cette occupation par la machinerie de transcription ne varie pas de façon homogène sur l'ensemble des LEPTM (cf. figure S3 en annexe de l'article, Harismendy et al., 2003 ; Oficjalska-Pham et al., 2006). Pour quelles raisons observe-t-on ces différences d'occupation et de transcription entre les gènes de classe III ? Ces observations reflètent-elles de réelles différences transcriptionnelles entre les gènes de classe III ? Si c'est le cas, la séquence individuelle de chaque gène porte-t-elle une information qui les discrimine vis-à-vis de la machinerie de transcription ? Ou bien les séquences adjacentes aux gènes influencent-elles la transcription de chacun des gènes de classe III ? Hormis le regroupement établi par rapport aux trois types de séquences promotrices identifiés, aucun autre regroupement entre les gènes de classe III n'apparaît. Nous devons toutefois considérer ces nuances lorsqu'il s'agit d'étudier individuellement chaque gène de classe III. C'est pourquoi l'analyse de seulement quelques transcrits par *northern-blot* s'avère complexe.

### 4.3.2 Synthèse, maturation, export, dégradation

Au cours de nos expériences, nous avons cherché à évaluer le niveau de la transcription en détectant les ARN synthétisés par l'ARN Pol III. Les *northern-blots* et marquage au tritium des ARN réalisés nous permettent de visualiser ces ARN. Mais, bien que nous ayons cherché à cibler spécifiquement les ARN néosynthétisés, nous ne pouvons pas exclure que les différences de niveau d'expression de ces ARN ne soient pas dûes à une variation seule de la synthèse. En effet, la voie de biosynthèse des ARNt est assez complexe. Une dérégulation des voies situées en aval de la synthèse (figure 34) peut donc amener des différences de niveau d'ARNt naissants qui ne seraient pas seulement dûes à une dérégulation de la synthèse.



**Figure 34. Flux simplifié des ARNt dans la cellule chez *Saccharomyces cerevisiae***

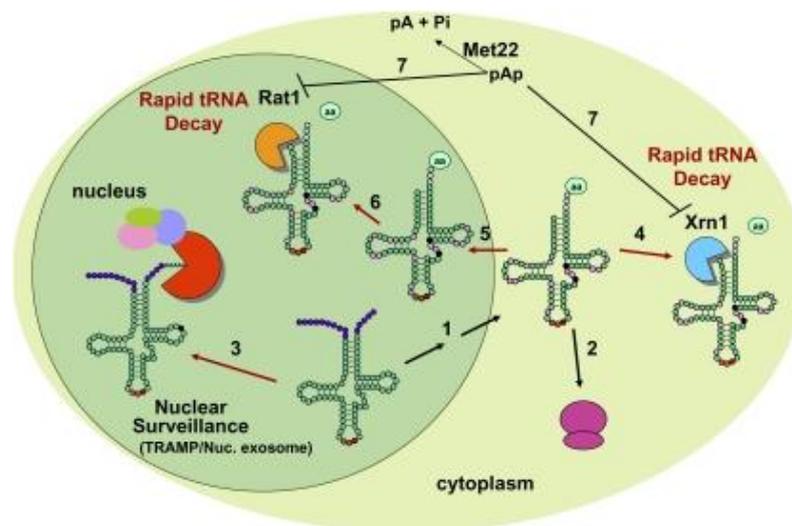
La transcription des ARNt dans le noyau, puis les pré-ARNt sont exportés dans le cytoplasme *via* entre autres l'exportine Los1. Après l'épissage de l'ARNt (intron en bleu excisé). (D'après Hopper et al., 2010)

Ainsi, on sait qu'un défaut de l'export des ARNt peut conduire à l'accumulation de leurs précurseurs (pour revue, Hopper et Shaheen, 2008). Alors, à partir de *northern-blots*, nous ne pouvons pas discriminer l'accumulation de ces précurseurs de la stimulation de leur synthèse.

De même, on peut envisager qu'un défaut de la maturation des ARNt puisse amener un déséquilibre dans le flux des ARNt et conduire à l'accumulation des précurseurs non maturés. Tout récemment, il a été montré que le répresseur Maf1 est capable d'affecter la maturation des ARNt (Karkusiewicz et al., 2011). Ce défaut pourrait-il lui expliquer l'augmentation des précurseurs d'ARNt que l'on observe par *northern-blot* dans nos souches délétées pour *MAF1* ?

De plus, il nous faut considérer les mécanismes de dégradation des ARNt. Lorsque les modifications des ARNt sont incorrectes ou insuffisantes (ARNt « hypomodifiés »), ils sont dégradés. Deux mécanismes régissent cette dégradation (figure 35) : le RTD (pour *rapid tRNA decay*) et la dégradation par l'exosome et le complexe TRAMP (pour revue, Reinisch et Wolin, 2007 ; Alexandrov et al., 2006). Si l'une ou l'autre des deux voies de dégradation venait à être interrompue, le stock des précurseurs d'ARNt pourrait considérablement augmenter. Les variations d'ARN que nous détectons par *northern-blot* ou par un marquage au tritium pourraient résulter soit d'un déséquilibre entre synthèse et dégradation des transcrits, soit d'une variation de leur synthèse.

Finalement, la détection des ARN néosynthétisés par l'ARN Pol III dans le but d'évaluer le niveau de la transcription par l'ARN Pol III s'avère délicate et complexe à interpréter.



**Figure 35. Les deux voies de dégradation des ARNt**

Les pré-ARNt sont transcrits dans le noyau puis exportés dans le cytoplasme (1) et les ARNt matures sont utilisés pour la traduction (2). Suite à des défauts dans les modifications du pré-ARNt, celui-ci peut être dégradé par l'exosome et le complexe TRAMP nucléaires (3). Si certaines autres modifications du pré-ARNt n'ont pas lieu, laissant un pré-ARNt fonctionnel mais pas complètement mature, celui-ci sera dégradé par le RTD, par Xrn1 dans le cytoplasme (4), ou par Rat1 dans le noyau (6) après une ré-importation dans le noyau (6). Le RTD peut être inhibé par la présence de pAp (3'-phospho-désoxy-5'-phosphate) régulée par Met22 (7). (D'après Phizicky et Hopper, 2010 ; pour revues, Reinisch et Wolin, 2007 ; Alexandrov et al., 2006)

On remarque que dans le processus de RTD, les deux exonucléases paralogues Xrn1 et Rat1 ont une fonction majeure. Au cours de nos expériences de double délétion, nous avons pu mettre en

évidence un lien entre Xrn1 et Sub1 : chacun des gènes n'est pas essentiel à la levure mais leur délétion conjointe affecte très fortement la croissance de la cellule. De manière intéressante, Rat1 est capable, lorsqu'il est muté, de stimuler la transcription d'un ARNt portant un défaut dans son promoteur (Di Segni et al., 1993). Il serait intéressant d'étudier le lien entre Sub1 et Xrn1 : sont-ils tous les deux impliqués dans la même voie de régulation de la transcription ?

## 4.4 D'autres régulateurs de la transcription par l'ARN Pol III ?

### 4.4.1 La répression de la transcription par l'ARN Pol III en réponse au 4NQO

En nous intéressant aux effets du 4NQO sur la transcription par l'ARN Pol III, nous nous attendions à ce qu'elle soit réprimée, de la même manière qu'avec les autres stress génotoxiques recensés dans la littérature (MMS, HU et UV notamment). Chez la levure, Maf1 est le seul répresseur identifié à ce jour. Étonnamment, nos expériences nous révèlent que Maf1 n'est pas le principal répresseur dans la régulation de la transcription par l'ARN Pol III en réponse au 4NQO : il existerait au moins un autre mécanisme impliqué dans cette répression. Une étude de la répression lors des stress réplicatifs (Nguyen et al., 2010) suggère également que Maf1 n'est pas le principal répresseur de la transcription par l'ARN Pol III. Il existerait donc des mécanismes indépendants de Maf1 capables de réprimer la transcription des gènes de classe III et leur identification reste à être élucidée.

### 4.4.2 Quels autres mécanismes de régulation de la transcription par l'ARN Pol III peuvent exister ?

Malgré la caractérisation de Sub1 en tant qu'activateur de la transcription par l'ARN Pol III et les nombreuses études sur le répresseur Maf1, il ne fait aucun doute que d'autres protéines régulent également la transcription. D'ailleurs, parallèlement à nos travaux, une étude a mis en évidence que des protéines ribosomales retrouvées dans la fraction activatrice TFIIE sont capables de stimuler la transcription par l'ARN Pol III (Dieci et al., 2009).

Aujourd'hui, notre laboratoire continue à chercher d'autres régulateurs et d'autres approches sont à l'étude.

La régulation de la transcription par l'ARN Pol III représente un mécanisme important pour la croissance et la prolifération des cellules, et elle est encore loin d'être complètement décryptée. Les ARN transcrits par l'ARN Pol III ont non seulement un rôle considérable dans la synthèse des

protéines, mais seraient également des éléments de régulation eux-mêmes. Par exemple, le clivage des ARNt peut conduire à une régulation transcriptionnelle en réponse à un stress (Thompson et Parker, 2009 ; Thompson et al., 2008). Par ailleurs, la maturation des ARNt seraient également contrôlées par les stress (pour article récent, Chan et al., 2010). La régulation de ces autres étapes de la vie des ARN transcrits peut-elle influencer la transcription par l'ARN Pol III ?

Finalement, comme l'écrit Robert White , "Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought" (White, 2011).

# Chapitre 5

## Procédures expérimentales

### 5.1 Méthodes de biologie cellulaire

#### 5.1.1 Souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* et conditions de culture

Les génotypes et noms des différentes souches de *S. cerevisiae* utilisées sont indiqués dans le tableau 3.

**Tableau 3. Les souches utilisées et leur génotype**

souche	génotype
YPH500 (Sikorsky and Hieter, 1989)	MAT $\alpha$ , ade2-101, his3- $\Delta$ 200, leu2- $\Delta$ 1, lys2-801, trp1- $\Delta$ 63, ura3-52
YPH500 Sub1-13Myc	MAT $\alpha$ , ade2-101, his3- $\Delta$ 200, leu2- $\Delta$ 1, lys2-801, trp1- $\Delta$ 63, ura3-52, SUB1-13Myc :kanMX6
YPH500 C160-HA	MAT $\alpha$ , ade2-101, his3- $\Delta$ 200, leu2- $\Delta$ 1, lys2-801, trp1- $\Delta$ 63, ura3-52, RPC160-3HA :kanMX6
YPH500 <i>sub1</i> $\Delta$	MAT $\alpha$ , ade2-101, his3- $\Delta$ 200, leu2- $\Delta$ 1, lys2-801, trp1- $\Delta$ 63, ura3-52, sub1 $\Delta$ ::KAN
YPH500 <i>maf1</i> $\Delta$	MAT $\alpha$ , ade2-101, his3- $\Delta$ 200, leu2- $\Delta$ 1, lys2-801, trp1- $\Delta$ 63, ura3-52, maf1 $\Delta$ ::URA3
YPH500 <i>sub1</i> $\Delta$ <i>maf1</i> $\Delta$	MAT $\alpha$ , ade2-101, his3- $\Delta$ 200, leu2- $\Delta$ 1, lys2-801, trp1- $\Delta$ 63, ura3-52, sub1 $\Delta$ ::KAN maf1 $\Delta$ ::URA3
BY4741 (INVITROGEN)	MAT $\alpha$ , his3- $\Delta$ 1, leu2- $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0
Sub1-GFP (INVITROGEN)	MAT $\alpha$ , his3- $\Delta$ 1, leu2- $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0, SUB1-GFP
BY4741 <i>sub1</i> $\Delta$	MAT $\alpha$ , his3- $\Delta$ 1, leu2- $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0 sub1 $\Delta$ ::HIS3
Souches de la banque EUROFAN II (EUROSCARF)	MAT $\alpha$ , his3- $\Delta$ 1, leu2- $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0 [ <i>gene of interest</i> ]::kanMX4

Le milieu de culture classique utilisé est le milieu riche *Yeast extract Peptone Dextrose* (YPD). Les cellules de *S. cerevisiae* sont cultivées à 30°C, et en agitation constante (180 rpm en incubateur Infors) lorsque la culture s'effectue en milieu liquide. Les milieux solides contiennent en plus de l'agarose. En fonction des caractéristiques génétiques des différentes souches, le milieu riche peut être substitué à un milieu appauvri spécifiquement pour un acide aminé.

Sauf indication contraire, les cellules ont pu être étudiées dans les conditions de culture liquide suivantes.

- **Phase exponentielle de croissance** : les cellules sont mises en culture liquide pendant au moins 3 heures jusqu'à obtention d'une  $DO_{600\text{ nm}}$  comprise entre 0,5 et 1 (soit entre  $5 \cdot 10^7$  et  $10^8$  cellules/mL).
- **Phase stationnaire de croissance** : les cellules sont ensemencées en culture liquide et laissées à 30°C sous agitation pendant 5 jours.
- **Traitement au 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)** : une fois la phase exponentielle atteinte, les cellules sont incubées en présence de 4NQO à une concentration finale de 1 µg/mL, à 30°C sous agitation pendant 1 heure.
- **Traitement à la rapamycine** : une fois la phase exponentielle atteinte, les cellules sont incubées en présence de rapamycine à une concentration finale de 0,4 mg/mL, à 30°C sous agitation pendant 1 heure.

## 5.1.2 Transformation de levure

Pour une transformation de levures, 10 mL de levures en phase exponentielle sont prélevées et culottées rapidement par centrifugation (3 min, 4000 rpm). Le culot de cellules est délicatement resuspendu dans 1 mL de tampon LiAc/TE (LiAc 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) et les cellules sont lavées dans environ 1 mL de LiAc/TE. Les cellules sont finalement resuspendues dans 50 µL LiAc/TE.

A ces cellules, on ajoute environ 1 µg ADN, 5 µL d'entraîneur à 10 mg/mL (sperme de saumon préalablement dénaturé à 90°C pendant 5 min) et 350 µL LiAc/TE/PEG (LiAc/TE, polyéthylèneglycol 40%), .

Le tube est incubé à 30°C pendant 30 min avant de procéder à un choc thermique à 42°C pendant 15 min. Les cellules sont ensuite rapidement centrifugées et resuspendues dans 100 µL d'eau stérile avant d'être cultivées dans un milieu sélectif approprié.

## 5.1.3 Tests de croissance sur milieu solide

Les souches de levures sont cultivées en milieu YPD jusqu'à la phase exponentielle de croissance. Chaque dilution est réalisée dans du milieu YPD liquide à 30°C ; les cultures des souches testées sont ramenées à  $DO_{600\text{ nm}} = 10^{-1}$ . Ensuite, chacune des souches est diluée au 1/10 successivement quatre fois (soit, de  $10^{-2}$  à  $10^{-5}$ ). Une goutte (4 µL) de chaque dilution ( $DO_{600\text{ nm}} = 10^{-1}$  à  $10^{-5}$ ) est déposée sur boîte de Pétri contenant du milieu YPD solide.

Pour les tests de thermosensibilité, les boîtes sont incubées à 16°C, 25°C, 30°C ou 37°C. Les tests avec drogues sont réalisés sur des milieux YPD contenant du 4NQO ou de la rapamycine ou de la caféine ou de l'hydroxyurée à différentes concentrations et incubées à 30°C.

## 5.1.4 Méthodes d'imagerie

### 5.1.4.1 Observation *in vivo* de la protéine de fusion Sub1-GFP

Pour chacune des souches Sub1-GFP et BY4741 (souche sauvage), l'équivalent de  $10^8$  cellules est rapidement lavé dans 1 mL de PBS 1X refroidi (4°C) puis délicatement resuspendu dans 100  $\mu$ L de PBS 1X froid. La suspension est directement montée entre lame et lamelle et observée au microscope à fluorescence.

### 5.1.4.2 Immunofluorescence

Entre 5.108 et 2.109 cellules cultivées en YPD sont fixées pendant 20 min par ajout de formaldéhyde à 3,7 % final, puis centrifugées (3 min, 4000 rpm) et lavées deux fois dans un tube EPPENDORF avec 1 mL de tampon KP-Sorbitol ( $K_2HPO_4$  15 mM,  $KH_2PO_4$  35 mM,  $MgCl_2$  0,5 mM, sorbitol 1,2 M). Les cellules sont resuspendues dans 1 mL de KP-Sorbitol et sont conservées à 4°C.

Les parois des cellules précédemment fixées (200  $\mu$ L) sont perméabilisées par l'addition de 20  $\mu$ L de  $\beta$  mercaptoéthanol et de zymolyase 100T (AMSBIO) à 0,2 mg/mL final, en incubant à 37°C pendant 30 à 45 min. Cette étape permet d'obtenir des cellules dont les parois sont partiellement digérées, perméables aux anticorps : des sphéroplast.

Ces sphéroplast sont rapidement et délicatement lavés (en les culottant à la centrifugeuse de paillasse par des pulses de 10 à 20 s) une fois avec 500  $\mu$ L de PBS-FG (PBS 1X, gélatine de poisson 0,4 %), deux fois dans 500  $\mu$ L de PBS-FGT (PBS-FG, Triton 0,1 %), et une nouvelle fois dans 500  $\mu$ L de PBS-FG. Les cellules sont alors resuspendues dans 50  $\mu$ L de PBS-FG contenant l'anticorps primaire dilué (dilutions : voir tableau 4), et incubées 1h à température ambiante, avec une légère agitation du tube EPPENDORF.

Ensuite, les cellules sont lavées rapidement et doucement une fois avec 500  $\mu$ L de PBS-FG, deux fois dans 500  $\mu$ L de PBS-FGT, une nouvelle fois dans 500  $\mu$ L de PBS-FG et finalement resuspendues dans 50  $\mu$ L de PBS-FG contenant l'anticorps secondaire dilué (dilutions : voir tableau b). La suspension cellulaire est incubée 1 h à température ambiante et dans l'obscurité, avec une légère agitation.

Les cellules sont lavées rapidement et doucement une fois avec 500  $\mu$ L de PBS-FG et deux fois dans 500  $\mu$ L de PBS-FGT avant d'être reprises dans 500  $\mu$ L de PBS-FG auxquels sont ajoutés 5  $\mu$ L de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, qui marque l'ADN) à 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L final. Le mélange est incubé 2 min à température ambiante, puis les cellules sont lavées une fois avec 500  $\mu$ L de PBS-FG et resuspendues dans 10  $\mu$ L de PBS 1X.

La préparation cellulaire est montée sur lame et lamelle et observée au microscope à fluorescence.

**Tableau 4. Facteurs de dilutions des anticorps utilisés en immunofluorescence et en western-blot**

anticorps		dilution en western-blot	dilution en immunofluorescence
anticorps primaires	anti-Sub1 (polyclonal, lapin)	1 / 5 000	1 / 500
	anti-Maf1 (polyclonal, lapin)	1 / 10 000	1/500
	anti-myc (9E10, monoclonal, souris)	1 / 10 000	1 / 500
	anti-HA (12CA5, monoclonal, souris)	1 / 10 000	1/200
	anti-A190 (polyclonal, lapin)	-	1 / 200
anticorps secondaires	anti-souris couplé à la peroxydase (PROMEGA)	1 / 10 000	-
	anti-lapin couplé à la peroxydase (PROMEGA)	1 / 10 000	-
	anti-souris couplé à un fluorochrome ALEXA (INVITROGEN)	-	1 / 100
	anti-lapin couplé à un fluorochrome ALEXA (INVITROGEN)	-	1 / 100

### 5.1.5 Acquisition d'images

Les suspensions cellulaires préparées (cf. 2.3.1. ou 2.3.2.) et montées entre lame et lamelle sont observées en microscopie à épifluorescence. Le microscope (LEICA, modèle DM RXA) est équipé d'un dispositif caméra CCD / ordinateur permettant l'acquisition d'images numériques à l'aide du logiciel METAMORPH. Ces images sont ensuite traitées sous PHOTOSHOP (ADOBE), en appliquant les mêmes réglages informatiques (contraste, luminosité, niveaux) aux images à comparer entre elles.

## 5.2 Méthodes de biologie moléculaire

### 5.2.1 Délétion de *SUB1* dans les souches de la banque EUROFAN II

Une cassette de délétion a été construite par PCR suivant la méthode décrite par Longtine et al., 1998 en utilisant le plasmide pFA6a-HIS3MX6 et les oligos suivants :

Amorce F1 : 5' ttttcgacatatatacaaacacaagcgctatgCGGATCCCCGGGTTAATTAA 3'

Amorce R1 : 5' tgacataagcaagctcaacttcaggactattaGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'

(en minuscules, les séquences nucléotiques permettant de spécifier l'amont et l'aval du gène *SUB1* (+1kb en amont et +1 kb en aval ; en majuscules, les séquences d'amplification du marqueur HIS3MX6 contenu dans le plasmide)

Cette cassette a été ensuite transformée dans les levures pour déléter *SUB1* par recombinaison homologue. Les clones transformés ont été sélectionnés sur un milieu dépourvu d'histidine.

La délétion de *SUB1* a été contrôlée à la fois par PCR (mêmes amorces F1 et R1, amorces internes au gène *his5+* et amorces en amont et en aval de *SUB1*) sur l'ADNg des clones sélectionnés et par *western-blot* (anticorps anti-Sub1) sur les extraits protéiques de ces clones.

## 5.2.2 Extraction d'ADNg

A partir d'1 mL de culture de levure, les cellules sont centrifugées dans un tube eppendorf (1 min, 14000 rpm). Le culot est resuspendu dans environ 100 µL d'eau stérile. On y ajoute 200 µL de billes *acid-washed* SIGMA, 200 µL de tampon d'extraction (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, SDS 1%, Triton 2 %) et 200 µL de solution PCI (phénol:chloroforme:isoamylique 49,5:49,5:1).

Le tube est vortexé 6 minutes puis on y ajoute 200 µL de TE(Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1mM) avant de centrifuger 5 min à 14000 rpm.

On récupère la phase aqueuse dans un nouveau tube EPPENDORF et on précipite l'ADN en ajoutant 1 mL d'éthanol 100 % pendant 1 min à température ambiante. On centrifuge alors 5 min, 14000 rpm et on sèche le culot d'ADN (au *speed-vacuum*).

Le culot d'ADN est finalement resuspendu dans 20 µL d'eau stérile.

## 5.2.3 Extraction protéique à l'acide trichloroacétique (TCA)

À partir de 10 mL de levures cultivées à 30°C ( $DO_{600\text{ nm}} = 1$ ), les cellules sont centrifugées (3 min, 4000 rpm) et le culot est resuspendu dans 200 µL d'acide trichloroacétique (TCA) 20 % additionnés de 200 µL de billes de verre (0,17 mm de diamètre) dans un tube EPPENDORF. Les cellules sont lysées par vortex (1 min). Le liquide est récupéré dans un nouveau tube EPPENDORF tandis que les billes sont rincées deux fois avec 200 µL de TCA 5 % et à nouveau vortexées. Le tout est centrifugé 5min à 14000 rpm et 4°C. Le culot obtenu, qui contient les protéines précipitées au TCA, est lavé avec 400 µL de tampon Tris-HCl 1,5 M. pH 8,8. Le culot est repris dans 40 µL de tampon Laemmli pH 8,8. Si nécessaire, 1 à 10 µL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 sont ajoutés jusqu'à l'obtention d'une coloration bleue. La suspension est bouillie (5 min, 95°C), puis centrifugée (5 min, 5000 rpm). Les protéines sont quantifiées par la réaction de Bradford (réactif de Bradford (BIO-RAD), lecture à  $DO_{595\text{ nm}}$ ).

## 5.2.4 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et immunodétection de protéines (*western-blot*)

Les protéines extraites au TCA et dénaturées sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % dans un tampon de migration glycine 192 mM, Tris 25 mM, SDS 0,1 %.

Les protéines du gel sont ensuite electro-transférées sur une membrane de nitrocellulose, par transfert semi-sec avec un tampon glycine 36 mM, Tris 48 mM, SDS 0,037 %, éthanol 20%.

La membrane est incubée 30 min dans du tampon PBST-lait (PBS 1X, Tween20 0,1 %, lait écrémé 15 %) puis 1 h avec l'anticorps primaire dilué (dilutions : voir tableau 4)) dans du tampon PBST (PBS 1X, Tween20 0,1 %). La membrane est ensuite lavée trois fois 5 min avec du PBST et est incubée 30 min avec l'anticorps secondaire (dilutions : voir tableau 4) qui est couplé à une peroxydase. Après trois autres lavages de 10 min chacun avec du PBST, la fixation des anticorps est révélée par autoradiographie en ajoutant un réactif qui est oxydé par la peroxydase (kit ECL d'AMERSHAM).

### 5.2.5 Extraction des ARN

A partir d'une culture de levures, 50 mL de cellules sont prélevées et centrifugées (3 min, 4000 rpm) puis resuspendues dans 500 µL de tampon AE (acétate de sodium pH 5,3 50 mM, EDTA 10 mM). On y ajoute 50 µL de SDS 10% puis on vortexe. On ajoute ensuite 500 µL de phénol (8-hydroxyquinolone 0,1% équilibré dans le tampon AE) et on vortexe trois fois 20 secondes en prenant soin de refroidir la suspension entre chaque vortex pendant 20 secondes dans la glace.

La préparation est ensuite incubée à 65°C pendant 5 min avant d'être congelée dans un mélange d'éthanol-carboglace. On laisse ensuite décongeler à température ambiante puis on centrifuge 4 min, 14 000 rpm. 450 µL de la phase aqueuse sont prélevés dans un nouveau tube EPPENDORF. Les protéines restantes sont extraites en ajoutant 450 µL de PCI (phénol:chloroforme:isoamylque 49,5:49,5:1), puis en vortexant 1 min et en centrifugeant 4 min, 14000 rpm. Dans un nouveau tube, 350 µL de phase aqueuse sont prélevés.

Les ARN sont alors précipités par ajout de 35 µL d'acétate de sodium pH 5,3, 3 M et de 875 µL d'éthanol 100 %, en incubant 30 min à -80°C ou dans un mélange d'éthanol-carboglace. Après une centrifugation de 30 min, 14 000 rpm, à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est rincé avec 1 mL d'éthanol 80 % refroidi préalablement à -20°C. Le culot est séché à 90°C pendant 5 min, avant de le resuspendre dans 50 µL d'eau DEPC (eau traitée au DiEthyl PyroCarbonate) au vortexer et par incubation 10 min à 65-70°C pour dissoudre les ARNs.

### 5.2.6 Détection d'ARN (*northern-blot*)

Les ARN extraits sont séparés par électrophorèse sur un gel d'acrylamide 8 %/urée 7 M (tampon de migration : TBE 1X). Les ARN peuvent être colorés dans un bain de BET puis décolorés dans un bain de TBE 1X.

Les ARN du gel sont ensuite electro-transférés sur une membrane de nitrocellulose, par transfert semi-sec dans du TBE 1X. Les ARN sont ensuite fixés sur la membrane au ultra-violet (Stratalinker, mode « auto-crosslink » à 1200 joules).

Les ARN de la membrane peuvent être colorés au bleu de méthylène (bleu methylene : 0,04% ; acétate de sodium 0,5 M pH 5,2) puis décolorée dans de l'eau.

La radiodétection d'ARN nécessite la pré-hybridation de la membrane portant les ARN : la membrane est incubée à 42°C dans du tampon d'hybridation (Rapid-Hyb Buffer, GE HEALTHCARE) pendant au moins 1 h.

Après préhybridation, la membrane est hybridée à au moins 42°C selon la sonde, dans le tampon d'hybridation. La sonde utilisée pour détecter les ARNt est préparée par kination de 10 pmol d'oligonucléotides : 5 à 15 µL d'ATPγ sont ajoutés aux oligonucléotides, avec 2 µL de T4 polynucléotide kinase (PNK), 3 µL de tampon pour la PNK, la kination a lieu à 37°C, 30 min, puis l'arrêt de la kinase est opérée par 15 min à 65 °C. La sonde est ensuite purifiée sur une colonne G25, en centrifugeant 2 min à 4000 rpm.

Après l'hybridation par la sonde, la membrane est lavée plusieurs fois (10 min par lavage) avec du SSC 6X (en descendant jusqu'à 0,5X), SDS 0,1 % à la température d'hybridation (voire plus), jusqu'à détection d'un signal satisfaisant.



---

# Annexes

---

## Liste des gènes et protéines reliés à Sub1

La liste des protéines interagissant avec Sub1 provient du *Biological General Repository for Interaction Datasets* (BioGRID, Stark et al., 2006) accessible sur l'internet (requête : "Sub1" / "All organisms"). La description de ces interactants provient de la *Saccharomyces Genome Database*, également accessible sur l'internet. Les gènes surlignés de gris sont ceux sélectionnés pour la double délétion.

Nomenclature	Gène	Description	Experiment Type	Type d'interaction avec SUB1
YOR141C	ARP8	Nuclear actin-related protein involved in chromatin remodeling	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YJL115W	ASF1	Nucleosome assembly factor	Negative Genetic	genetic interactions
YNL039W	BDP1	Essential subunit of RNA polymerase III transcription factor (TFIIIB)	Far Western	physical interactions
YER155C	BEM2	Rho GTPase activating protein (RhoGAP) involved in the control of cytoskeleton organization and cellular morphogenesis	Negative Genetic	genetic interactions
YNR051C	BRE5	Ubiquitin protease cofactor	Negative Genetic	genetic interactions
YOR026W	BUB3	Kinetochores checkpoint WD40 repeat protein that localizes to kinetochores during prophase and metaphase	Phenotypic Suppression	genetic interactions
YHR114W	BZZ1	SH3 domain protein implicated in the regulation of actin polymerization	Negative Genetic	genetic interactions
YNL161W	CBK1	Serine/threonine protein kinase that regulates cell morphogenesis pathways	Negative Genetic	genetic interactions
YHR107C	CDC12	Component of the septin ring of the mother-bud neck that is required for cytokinesis	Negative Genetic	genetic interactions
YDL220C	CDC13	Single stranded DNA-binding protein found at TG1-3 telomere G-tails	Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YBR160W	CDC28	Catalytic subunit of the main cell cycle cyclin-dependent kinase (CDK)	Negative Genetic	genetic interactions
YFL009W	CDC4	F-box protein required for G1/S and G2/M transition	Negative Genetic	genetic interactions
YLR103C	CDC45	DNA replication initiation factor	Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YGL130W	CEG1	Alpha (guanylyltransferase) subunit of the mRNA capping enzyme	Negative Genetic	genetic interactions
YPL228W	CET1	Beta (RNA 5'-triphosphatase) subunit of the mRNA capping enzyme	Negative Genetic	genetic interactions
YMR198W	CIK1	Kinesin-associated protein required for both karyogamy and mitotic spindle organization	Negative Genetic	genetic interactions
YPL256C	CLN2	G1 cyclin involved in regulation of the cell cycle	Negative Genetic	genetic interactions
YCR086W	CSM1	Nucleolar protein that forms a complex with Lrs4p and then Mam1p at kinetochores during meiosis I to mediate accurate homolog segregation	Positive Genetic	genetic interactions
YKL002W	DID4	Class E Vps protein of the ESCRT-III complex	Negative Genetic	genetic interactions
YKL213C	DOA1	WD repeat protein required for ubiquitin-mediated protein degradation	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YIR010W	DSN1	Essential component of the MIND kinetochore complex (Mtw1p Including Nnf1p-Nsl1p-Dsn1p) which joins kinetochore subunits contacting DNA to those contacting microtubules	Affinity Capture-MS	physical interactions
YGL043W	DST1	General transcription elongation factor TFIIIS	Synthetic Rescue	genetic interactions
YPR023C	EAF3	Esa1p-associated factor	Phenotypic Suppression	genetic interactions
YBL047C	EDE1	Key endocytic protein involved in a network of interactions with other endocytic proteins	Negative Genetic	genetic interactions
YHR174W	ENO2	Enolase II	Negative Genetic	genetic interactions
YMR220W	ERG8	Phosphomevalonate kinase	Negative Genetic	genetic interactions
YMR277W	FCP1	Carboxy-terminal domain (CTD) phosphatase	Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YDR130C	FIN1	Spindle pole body-related intermediate filament protein	Affinity Capture-Western	physical interactions
YGR252W	GCN5	Histone acetyltransferase	Positive Genetic	genetic interactions
YER083C	GET2	Subunit of the GET complex	Negative Genetic	genetic interactions
YEL003W	GIM4	Subunit of the heterohexameric cochaperone prefoldin complex which binds specifically to cytosolic chaperonin and transfers target proteins to it	Positive Genetic	genetic interactions
YNL255C	GIS2	Translational activator for mRNAs with internal ribosome entry sites	Negative Genetic	genetic interactions
YDR331W	GPI8	ER membrane glycoprotein subunit of the glycosylphosphatidylinositol transamidase complex that adds glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors to newly synthesized proteins	Positive Genetic	genetic interactions
YKR067W	GPT2	Glycerol-3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate-specific sn-1 acyltransferase located in lipid particles and the ER	Negative Genetic	genetic interactions
YBL032W	HEK2	RNA binding protein involved in the asymmetric localization of ASH1 mRNA	Affinity Capture-RNA	physical interactions
YBR009C	HHF1	Histone H4	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YBR010W	HHT1	Histone H3	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YLR113W	HOG1	Mitogen-activated protein kinase involved in osmoregulation via three independent osmosensors	Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YGL194C	HOS2	Histone deacetylase required for gene activation via specific deacetylation of lysines in H3 and H4 histone tails	Negative Genetic	genetic interactions
YOL068C	HST1	NAD(+)-dependent histone deacetylase	Phenotypic Suppression	genetic interactions
YGL253W	HXK2	Hexokinase isoenzyme 2 that catalyzes phosphorylation of glucose in the cytosol	Synthetic Rescue	genetic interactions
YLR384C	IKI3	Subunit of Elongator complex	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YOL081W	IRA2	GTPase-activating protein that negatively regulates RAS by converting it from the GTP- to the GDP-bound inactive form	Negative Genetic	genetic interactions
YGL173C	KEM1	Evolutionarily-conserved 5'-3' exonuclease component of cytoplasmic processing (P) bodies involved in mRNA decay	Negative Genetic	genetic interactions
YDL108W	KIN28	Serine/threonine protein kinase	Synthetic Lethality	genetic interactions
YOR123C	LEO1	Component of the Paf1 complex	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YHR081W	LRP1	Nuclear exosome-associated nucleic acid binding protein	Synthetic Lethality	genetic interactions
YJL124C	LSM1	Lsm (Like Sm) protein	Negative Genetic	genetic interactions
YNL006W	LST8	Protein required for the transport of amino acid permease Gap1p from the Golgi to the cell surface	Negative Genetic	genetic interactions
YAL024C	LTE1	Protein similar to GDP/GTP exchange factors but without detectable GEF activity	Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YNL307C	MCK1	Protein serine/threonine/tyrosine (dual-specificity) kinase involved in control of chromosome segregation and in regulating entry into meiosis	Dosage Rescue, Negative Gen	genetic interactions
YOL135C	MED7	Subunit of the RNA polymerase II mediator complex	Negative Genetic	genetic interactions
YPL169C	MEX67	Poly(A)RNA binding protein involved in nuclear mRNA export	Negative Genetic	genetic interactions

YJL183W	MNN11	Subunit of a Golgi mannosyltransferase complex that also contains Anp1p	Negative Genetic	genetic interactions
YML128C	MSC1	Protein of unknown function	Negative Genetic	genetic interactions
YGL122C	NAB2	Nuclear polyadenylated RNA-binding protein required for nuclear mRNA export and poly(A) tail length control	Affinity Capture-RNA	physical interactions
YNL124W	NAF1	RNA-binding protein required for the assembly of box H/ACA snoRNPs and thus for pre-rRNA processing	Affinity Capture-MS	physical interactions
YKR048C	NAP1	Protein that interacts with mitotic cyclin Clb2p	Negative Genetic	genetic interactions
YDR162C	NBP2	Protein involved in the HOG (high osmolarity glycerol) pathway	Negative Genetic	genetic interactions
YPR052C	NHP6A	High-mobility group (HMG) protein that binds to and remodels nucleosomes	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YOR209C	NPT1	Nicotinate phosphoribosyltransferase	Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YML103C	NUP188	Subunit of the nuclear pore complex (NPC)	Negative Genetic	genetic interactions
YGR119C	NUP57	Nucleoporin, essential subunit of the nuclear pore complex (NPC)	Negative Genetic	genetic interactions
YJR073C	OPI3	Phospholipid methyltransferase (methylene-fatty-acyl-phospholipid synthase)	Positive Genetic	genetic interactions
YLR350W	ORM2	Evolutionarily conserved protein	Negative Genetic	genetic interactions
YJL128C	PBS2	MAP kinase kinase that plays a pivotal role in the osmosensing signal-transduction pathway	Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YOR360C	PDE2	High-affinity cyclic AMP phosphodiesterase	Negative Genetic	genetic interactions
YNL097C	PHO23	Probable component of the Rpd3 histone deacetylase complex	Synthetic Growth Defect, phenotypic enhancement	genetic interactions
YPL031C	PHO85	Cyclin-dependent kinase	Biochemical Activity	physical interactions
YML069W	POB3	Subunit of the heterodimeric FACT complex (Spt16p-Pob3p)	Negative Genetic	genetic interactions
YDL102W	POL3	Catalytic subunit of DNA polymerase delta	Negative Genetic	genetic interactions
YJR043C	POL32	Third subunit of DNA polymerase delta	Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YJL203W	PRP21	Subunit of the SF3a splicing factor complex	Negative Genetic	genetic interactions
YOR361C	PRT1	eIF3b subunit of the core complex of translation initiation factor 3 (eIF3)	Positive Genetic	genetic interactions
YDR505C	PSP1	Asn and gln rich protein of unknown function	Negative Genetic	genetic interactions
YAL043C	PTA1	Subunit of holo-CPF	Reconstituted Complex	physical interactions
YDL006W	PTC1	Type 2C protein phosphatase (PP2C)	Negative Genetic, Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YNL216W	RAP1	DNA-binding protein involved in either activation or repression of transcription	Positive Genetic	genetic interactions
YEL050C	RML2	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit	Negative Genetic	genetic interactions
YMR235C	RNA1	GTPase activating protein (GAP) for Gsp1p	Negative Genetic	genetic interactions
YGL044C	RNA15	Cleavage and polyadenylation factor I (CF I) component involved in cleavage and polyadenylation of mRNA 3' ends	Reconstituted Complex	physical interactions
YGL070C	RPB9	RNA polymerase II subunit B12	Synthetic Rescue	genetic interactions
YDL020C	RPN4	Transcription factor that stimulates expression of proteasome genes	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YNL302C	RPS19B	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	Positive Genetic	genetic interactions
YDR289C	RTT103	Protein that interacts with exonuclease Rat1p and Rai1p and plays a role in transcription termination by RNA polymerase II	Negative Genetic	genetic interactions
YLL002W	RTT109	Histone acetyltransferase critical for cell survival in the presence of DNA damage during S phase	Negative Genetic	genetic interactions
YBR095C	RXT2	Subunit of the histone deacetylase Rpd3L complex	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YMR263W	SAP30	Subunit of a histone deacetylase complex	Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YMR272C	SCS7	Sphingolipid alpha-hydroxylase	Negative Genetic	genetic interactions
YIL076W	SEC28	Epsilon-COP subunit of the coatomer	Negative Genetic	genetic interactions
YKR029C	SET3	Defining member of the SET3 histone deacetylase complex which is a meiosis-specific repressor of sporulation genes	Negative Genetic	genetic interactions
YBR103W	SIF2	WD40 repeat-containing subunit of the Set3C histone deacetylase complex	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YOL004W	SIN3	Component of the Sin3p-Rpd3p histone deacetylase complex	Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YNL236W	SIN4	Subunit of the RNA polymerase II mediator complex	Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YDR088C	SLU7	RNA splicing factor	Negative Genetic	genetic interactions
YBR182C	SMP1	Putative transcription factor involved in regulating the response to osmotic stress	Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YGL115W	SNF4	Activating gamma subunit of the AMP-activated Snf1p kinase complex (contains Snf1p and a Sjp1p/Sjp2p/Gal83p family member)	Negative Genetic	genetic interactions
YCR033W	SNT1	Subunit of the Set3C deacetylase complex that interacts directly with the Set3C subunit	Negative Genetic	genetic interactions
YJR104C	SOD1	Cytosolic copper-zinc superoxide dismutase	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YGL127C	SOH1	Subunit of the RNA polymerase II mediator complex	Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YMR117C	SPC24	Component of the evolutionarily conserved kinetochore-associated Ndc80 complex (Ndc80p-Nuf2p-Spc24p-Spc25p)	Synthetic Growth Defect	genetic interactions
YEL031W	SPF1	P-type ATPase	Negative Genetic	genetic interactions
YER161C	SPT2	Protein involved in negative regulation of transcription	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YML010W	SPT5	Protein involved in regulating Pol I and Pol II transcription and pre-mRNA processing	Affinity Capture-MS	physical interactions
YLR005W	SSL1	Component of the core form of RNA polymerase transcription factor TFIIF	Negative Genetic	genetic interactions
YLR452C	SST2	GTPase-activating protein for Gpa1p	Negative Genetic	genetic interactions
YNL222W	SSU72	Transcription/RNA-processing factor that associates with TFIIF and cleavage/polyadenylation factor Pta1p	Negative Genetic	genetic interactions
YPR086W	SUA7	Transcription factor TFIIF	Reconstituted Complex	physical interactions
YPR009W	SUT2	Putative transcription factor	Negative Genetic	genetic interactions
YJL187C	SWE1	Protein kinase that regulates the G2/M transition by inhibition of Cdc28p kinase activity	Biochemical Activity	physical interactions
YJL176C	SWI3	Subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex	Positive Genetic	genetic interactions
YER111C	SWI4	DNA binding component of the SBF complex (Swi4p-Swi6p)	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YDR260C	SWM1	Subunit of the anaphase-promoting complex	Negative Genetic	genetic interactions

YBR123C	TFC1	One of six subunits of the RNA polymerase III transcription initiation factor complex (TFIIIC)	Far Western	physical interactions
YAL001C	TFC3	Largest of six subunits of the RNA polymerase III transcription initiation factor complex (TFIIIC)	Far Western	physical interactions
YOL006C	TOP1	Topoisomerase I	Negative Genetic	genetic interactions
YER151C	UBP3	Ubiquitin-specific protease that interacts with Bre5p to co-regulate anterograde and retrograde transport between the ER and Golgi	Negative Genetic	genetic interactions
YER151C	UBP3	Ubiquitin-specific protease that interacts with Bre5p to co-regulate anterograde and retrograde transport between the ER and Golgi	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YNR006W	VPS27	Endosomal protein that forms a complex with Hse1p	Negative Genetic	genetic interactions
YML041C	VPS71	Nucleosome-binding component of the SWR1 complex	Phenotypic Enhancement	genetic interactions
YHR135C	YCK1	Palmitoylated plasma membrane-bound casein kinase I isoform	Biochemical Activity	physical interactions
YLR298C	YHC1	Component of the U1 snRNP complex required for pre-mRNA splicing	Negative Genetic	genetic interactions
YLR262C	YPT6	Rab family GTPase	Negative Genetic	genetic interactions
YGR270W	YTA7	Protein that localizes to chromatin and has a role in regulation of histone gene expression	Phenotypic Suppression	genetic interactions
YPR098C		Protein of unknown function	Negative Genetic	genetic interactions

## Liste des gènes choisis pour la double délétion

La description des gènes provient de la *Saccharomyces Genome Database*, accessible sur l'internet. Les gènes surlignés de gris sont ceux sélectionnés à partir de la liste BioGRID.

	Gène	Nomenclature	Description
1	ASF1	YJL115W	Nucleosome assembly factor, involved in chromatin assembly and disassembly, anti-silencing protein that causes derepression of silent loci when overexpressed; plays a role in regulating Ty1 transposition
2	BEM2	YER155C	Rho GTPase activating protein (RhoGAP) involved in the control of cytoskeleton organization and cellular morphogenesis; required for bud emergence
3	BRE5	YNR051C	Ubiquitin protease cofactor, forms deubiquitination complex with Ubp3p that coregulates anterograde and retrograde transport between the endoplasmic reticulum and Golgi compartments; null is sensitive to brefeldin A
4	CIK1	YMR198W	Kinesin-associated protein required for both karyogamy and mitotic spindle organization, interacts stably and specifically with Kar3p and may function to target this kinesin to a specific cellular role; has similarity to Vik1p
5	CKA1	YJL035C	Alpha catalytic subunit of casein kinase 2 (CK2), a Ser/Thr protein kinase with roles in cell growth and proliferation; CK2, comprised of CKA1, CKA2, CKB1 and CKB2, has many substrates including transcription factors and all RNA polymerases
6	CKA2	YOR061W	Alpha' catalytic subunit of casein kinase 2 (CK2), a Ser/Thr protein kinase with roles in cell growth and proliferation; CK2, comprised of CKA1, CKA2, CKB1 and CKB2, has many substrates including transcription factors and all RNA polymerase
7	CKB1	YGL019W	Beta regulatory subunit of casein kinase 2 (CK2), a Ser/Thr protein kinase with roles in cell growth and proliferation; CK2, comprised of CKA1, CKA2, CKB1 and CKB2, has many substrates including transcription factors and all RNA polymerases
8	CKB2	YOR039W	Beta' regulatory subunit of casein kinase 2 (CK2), a Ser/Thr protein kinase with roles in cell growth and proliferation; CK2, comprised of CKA1, CKA2, CKB1 and CKB2, has many substrates including transcription factors and all RNA polymerase
9	CLN2	YPL256C	G1 cyclin involved in regulation of the cell cycle; activates Cdc28p kinase to promote the G1 to S phase transition; late G1 specific expression depends on transcription factor complexes, MBF (Swi6p-Mbp1p) and SBF (Swi6p-Swi4p)
10	ELP3	YPL086C	Subunit of Elongator complex, which is required for modification of wobble nucleosides in tRNA; exhibits histone acetyltransferase activity that is directed to histones H3 and H4; disruption confers resistance to <i>K. lactis</i> zymotoxin
11	GCN5	YGR252W	Acetyltransferase, modifies N-terminal lysines on histones H2B and H3; acetylates Rsc4p, a subunit of the RSC chromatin-remodeling complex, altering replication stress tolerance; catalytic subunit of the ADA and SAGA histone acetyltransferase complexes; founding member of the Gcn5p-related N-acetyltransferase superfamily; mutant displays reduced transcription elongation in the G-less-based run-
12	GET2	YER083C	Subunit of the GET complex; involved in insertion of proteins into the ER membrane; required for the retrieval of HDEL proteins from the Golgi to the ER in an ERD2 dependent fashion and for meiotic nuclear division
13	HDA1	YNL021W	Putative catalytic subunit of a class II histone deacetylase complex that also contains Hda2p and Hda3p; Hda1p interacts with the Hda2p-Hda3p subcomplex to form an active tetramer; deletion increases histone H2B, H3 and H4 acetylation
14	HHT1	YBR010W	Histone H3, core histone protein required for chromatin assembly, part of heterochromatin-mediated telomeric and HM silencing; one of two identical histone H3 proteins (see HHT2); regulated by acetylation, methylation, and phosphorylation
15	HHT2	YNL031C	Histone H3, core histone protein required for chromatin assembly, part of heterochromatin-mediated telomeric and HM silencing; one of two identical histone H3 proteins (see HHT1); regulated by acetylation, methylation, and phosphorylation
16	HOS2	YGL194C	Histone deacetylase required for gene activation via specific deacetylation of lysines in H3 and H4 histone tails; subunit of the Set3 complex, a meiotic-specific repressor of sporulation specific genes that contains deacetylase activity
17	HOS4	YJL112W	Subunit of the Set3 complex, which is a meiotic-specific repressor of sporulation specific genes that contains deacetylase activity; potential Cdc28p substrate
18	HST1	YOL068C	NAD(+)-dependent histone deacetylase; essential subunit of the Sum1p/Rfm1p/Hst1p complex required for ORC-dependent silencing and mitotic repression; non-essential subunit of the Set3C deacetylase complex; involved in telomere maintenance
19	HTZ1	YOL012C	Histone variant H2AZ, exchanged for histone H2A in nucleosomes by the SWR1 complex; involved in transcriptional regulation through prevention of the spread of silent heterochromatin
20	HXK2	YGL253W	Hexokinase isoenzyme 2 that catalyzes phosphorylation of glucose in the cytosol; predominant hexokinase during growth on glucose; functions in the nucleus to repress expression of HXK1 and GLK1 and to induce expression of its own gene
21	KEM1	YGL173C	Evolutionarily conserved 5'-3' exonuclease component of cytoplasmic processing (P) bodies involved in mRNA decay; plays a role in microtubule-mediated processes, filamentous growth, ribosomal RNA maturation, and telomere maintenance
22	MCK1	YNL307C	Protein serine/threonine/tyrosine (dual-specificity) kinase involved in control of chromosome segregation and in regulating entry into meiosis; related to mammalian glycogen synthase kinases of the GSK-3 family
23	MSC1	YML128C	Protein of unknown function; mutant is defective in directing meiotic recombination events to homologous chromatids; the authentic, non-tagged protein is detected in highly purified mitochondria and is phosphorylated
24	NAP1	YKR048C	Protein that interacts with mitotic cyclin Clb2p; required for the regulation of microtubule dynamics during mitosis; controls bud morphogenesis; involved in the transport of H2A and H2B histones to the nucleus; phosphorylated by CK2
25	NHP6A	YPR052C	High-mobility group (HMG) protein that binds to and remodels nucleosomes; involved in recruiting FACT and other chromatin remodelling complexes to the chromosomes; functionally redundant with Nhp6Bp; homologous to mammalian HMGB1 and HMGB2
26	PCL9	YDL179W	Cyclin, forms a functional kinase complex with Pho85p cyclin-dependent kinase (Cdk), expressed in late M/early G1 phase, activated by Swi5p
27	POL32	YJR043C	Third subunit of DNA polymerase delta, involved in chromosomal DNA replication; required for error-prone DNA synthesis in the presence of DNA damage and processivity; interacts with Hys2p, PCNA (Pol30p), and Pol1p
28	RAD51	YER095W	Strand exchange protein, forms a helical filament with DNA that searches for homology; involved in the recombinational repair of double-strand breaks in DNA during vegetative growth and meiosis; homolog of Dmc1p and bacterial RecA protein
29	RAD9	YDR217C	DNA damage-dependent checkpoint protein, required for cell-cycle arrest in G1/S, intra-S, and G2/M; transmits checkpoint signal by activating Rad53p and Chk1p; hyperphosphorylated by Mec1p and Tel1p; potential Cdc28p substrate
30	RPD3	YNL330C	Histone deacetylase; regulates transcription, silencing, and other processes by influencing chromatin remodeling; forms at least two different complexes which have distinct functions and members
31	RTT109	YLL002W	Histone acetyltransferase critical for cell survival in the presence of DNA damage during S phase; acetylates H3-K56 and H3-K9; involved in non-homologous end joining and in regulation of Ty1 transposition; interacts physically with Vps75p
32	SAS3	YBL052C	Histone acetyltransferase catalytic subunit of NuA3 complex that acetylates histone H3, involved in transcriptional silencing; homolog of the mammalian MOZ proto-oncogene; mutant has aneuploidy tolerance; sas3gcn5 double mutation is lethal
33	SET3	YKR029C	Defining member of the SET3 histone deacetylase complex which is a meiosis-specific repressor of sporulation genes; necessary for efficient transcription by RNAPII; one of two yeast proteins that contains both SET and PHD domains
34	SIR2	YDL042C	Conserved NAD+ dependent histone deacetylase of the Sirtuin family involved in regulation of lifespan; plays roles in silencing at HML, HMR, telomeres, and the rDNA locus; negatively regulates initiation of DNA replication
35	SNF4	YGL115W	Activating gamma subunit of the AMP-activated Snf1p kinase complex (contains Snf1p and a Sip1p/Sip2p/Gal83p family member); activates glucose-repressed genes, represses glucose-induced genes; role in sporulation, and peroxisome biogenesis
36	SNT1	YCR033W	Subunit of the Set3C deacetylase complex that interacts directly with the Set3C subunit, Sif2p; putative DNA-binding protein; mutant has increased aneuploidy tolerance
37	SRT1	YMR101C	Cis-prenyltransferase involved in synthesis of long-chain dolichols (19-22 isoprene units); as opposed to Rer2p which synthesizes shorter-chain dolichols; localizes to lipid bodies; transcription is induced during stationary phase
38	SWE1	YJL187C	Protein kinase that regulates the G2/M transition by inhibition of Cdc28p kinase activity; localizes to the nucleus and to the daughter side of the mother-bud neck; homolog of <i>S. pombe</i> Wee1p; potential Cdc28p substrate
39	TOP1	YOL006C	Topoisomerase I, nuclear enzyme that relieves torsional strain in DNA by cleaving and re-sealing the phosphodiester backbone; relaxes both positively and negatively supercoiled DNA; functions in replication, transcription, and recombination
40	TOR1	YJR066W	PIK-related protein kinase and rapamycin target; subunit of TORC1, a complex that controls growth in response to nutrients by regulating translation, transcription, ribosome biogenesis, nutrient transport and autophagy; involved in meiosis



---

# Bibliographie

---

- Aasland R., Stewart, A.F.& Gibson, T. (1996). The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem Sci*, 21(3), 87-88
- Adhikary S.& Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins *Nat Rev Mol Cell Biol* (Vol. 6, pp. 635-645).
- Alarcon C.M., Heitman, J.& Cardenas, M.E. (1999). Protein kinase activity and identification of a toxic effector domain of the target of rapamycin TOR proteins in yeast. *Mol Biol Cell*, 10(8), 2531-2546
- Alcasabas A.A., Osborn, A.J., Bachant, J., Hu, F., Werler, P.J., Bousset, K., Furuya, K., Diffley, J.F., Carr, A.M.& Elledge, S.J. (2001). Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53 *Nat Cell Biol* (Vol. 3, pp. 958-965).
- Alexandrov A., Chernyakov, I., Gu, W., Hiley, S.L., Hughes, T.R., Grayhack, E.J.& Phizicky, E.M. (2006). Rapid tRNA decay can result from lack of nonessential modifications *Mol Cell* (Vol. 21, pp. 87-96).
- Altman S. (2000). The road to RNase P. *Nat Struct Biol*, 7(10), 827-828
- Altman S. (2007). A view of RNase P. *Mol Biosyst*, 3(9), 604-607
- Alzuherrri H.M.& White, R.J. (1998). Regulation of a TATA-binding protein-associated factor during cellular differentiation *J Biol Chem* (Vol. 273, pp. 17166-17171).
- Andersen J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K., Ong, S.E., Lyon, C.E., Lamond, A.& Mann, M. (2005). Nucleolar proteome dynamics *Nature* (Vol. 433, pp. 77-83).
- Andrau J.C., Sentenac, A.& Werner, M. (1999). Mutagenesis of yeast TFIIIB70 reveals C-terminal residues critical for interaction with TBP and C34. *J Mol Biol*, 288(4), 511-520
- Andrau J.C.& Werner, M. (2001). B"-associated factor(s) involved in RNA polymerase III preinitiation complex formation and start-site selection *Eur J Biochem* (Vol. 268, pp. 5167-5175).
- Archambault J.& Friesen, J.D. (1993). Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III *Microbiol Rev* (Vol. 57, pp. 703-724).
- Archambault J., Milne, C.A., Schappert, K.T., Baum, B., Friesen, J.D.& Segall, J. (1992). The deduced sequence of the transcription factor TFIIIA from *Saccharomyces cerevisiae* reveals extensive divergence from *Xenopus* TFIIIA. *J Biol Chem*, 267(5), 3282-3288
- Arimbasseri A.G.& Bhargava, P. (2008). Chromatin structure and expression of a gene transcribed by RNA polymerase III are independent of H2A.Z deposition *Mol Cell Biol* (Vol. 28, pp. 2598-2607).
- Armache K.J., Mitterweger, S., Meinhart, A.& Cramer, P. (2005). Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J Biol Chem*, 280(8), 7131-7134
- Arrebola R., Manaud, N., Rozenfeld, S., Marsolier, M.C., Lefebvre, O., Carles, C., Thuriaux, P., Conesa, C.& Sentenac, A. (1998). Tau91, an essential subunit of yeast transcription factor IIIC, cooperates with tau138 in DNA binding. *Mol Cell Biol*, 18(1), 1-9

- Ashe M.P., De Long, S.K.& Sachs, A.B. (2000). Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Mol Biol Cell*, 11(3), 833-848
- Athineos D., Marshall, L.& White, R.J. (2010). Regulation of TFIIIB during F9 cell differentiation *BMC Mol Biol* (Vol. 11, pp. 21).
- Banati F., Koroknai, A., Salamon, D., Takacs, M., Minarovits-Kormuta, S., Wolf, H., Niller, H.H.& Minarovits, J. (2008). CpG-methylation silences the activity of the RNA polymerase III transcribed EBER-1 promoter of Epstein-Barr virus *FEBS Lett* (Vol. 582, pp. 705-709).
- Banerjee S., Kumar, B.R.& Kundu, T.K. (2004). General transcriptional coactivator PC4 activates p53 function *Mol Cell Biol* (Vol. 24, pp. 2052-2062).
- Bardeleben C., Kassavetis, G.A.& Geiduschek, E.P. (1994). Encounters of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III with its transcription factors during RNA chain elongation. *J Mol Biol*, 235(4), 1193-1205
- Barski A., Chepelev, I., Liko, D., Cuddapah, S., Fleming, A.B., Birch, J., Cui, K., White, R.J.& Zhao, K. (2010). Pol II and its associated epigenetic marks are present at Pol III-transcribed noncoding RNA genes *Nat Struct Mol Biol* (Vol. 17, pp. 629-634).
- Bartholomew B., Kassavetis, G.A.& Geiduschek, E.P. (1991). Two components of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor IIIB (TFIIIB) are stereospecifically located upstream of a tRNA gene and interact with the second-largest subunit of TFIIIC. *Mol Cell Biol*, 11(10), 5181-5189
- Beck T.& Hall, M.N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors *Nature* (Vol. 402, pp. 689-692).
- Bhargava P.& Kassavetis, G.A. (1999). Abortive initiation by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III. *J Biol Chem*, 274(37), 26550-26556
- Birch J.L., Tan, B.C., Panov, K.I., Panova, T.B., Andersen, J.S., Owen-Hughes, T.A., Russell, J., Lee, S.& Zomerdijk, J.C. (2009). FACT facilitates chromatin transcription by RNA polymerases I and III *EMBO J* (Vol. 28, pp. 854-865).
- Bjornsti M.A.& Houghton, P.J. (2004). Lost in translation: dysregulation of cap-dependent translation and cancer *Cancer Cell* (Vol. 5, pp. 519-523).
- Blum B.& Benvenisty, N. (2009). The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells *Cell Cycle* (Vol. 8, pp. 3822-3830).
- Bobkova E.V.& Hall, B.D. (1997). Substrate specificity of the RNase activity of yeast RNA polymerase III. *J Biol Chem*, 272(36), 22832-22839
- Bode A.M.& Dong, Z. (2007). The functional contrariety of JNK *Mol Carcinog* (Vol. 46, pp. 591-598).
- Boguta M., Czerska, K.& Zoładek, T. (1996). Mutation in a new gene MAF1 affects tRNA suppressor efficiency in *Saccharomyces cerevisiae* *Gene* (Vol. 185, pp. 291-296).
- Boguta M.& Graczyk, D. (2011). Reply to Willis et al.: Casein kinase II phosphorylation of Maf1 triggers RNA polymerase III activation *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 108, pp. E301-E301).
- Boguta M.& Graczyk, D. (2011). RNA polymerase III under control: repression and de-repression *Trends Biochem Sci* (pp. 10.1016/j.tibs.2011.1006.1008).
- Boisnard S., Lagniel, G., Garmendia-Torres, C., Molin, M., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M., Toledano, M.B., Labarre, J.& Chédin, S. (2009). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates the nuclear localization of Msn2 and Maf1 through thioredoxins in *Saccharomyces cerevisiae* *Eukaryotic Cell* (Vol. 8, pp. 1429-1438).
- Boisvert F., Van Koningsbruggen, S., Navascués, J.& Lamond, A. (2007). The multifunctional nucleolus *Nat Rev Mol Cell Biol* (Vol. 8, pp. 574-585).

- Bosc D.G., Lüscher, B.& Litchfield, D.W. (1999). Expression and regulation of protein kinase CK2 during the cell cycle *Mol Cell Biochem* (Vol. 191, pp. 213-222).
- Boulon S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.M.& Lamond, A.I. (2010). The nucleolus under stress. *Mol Cell*, 40(2), 216-227
- Braglia P., Dugas, S.L., Donze, D.& Dieci, G. (2007). Requirement of Nhp6 proteins for transcription of a subset of tRNA genes and heterochromatin barrier function in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol* (Vol. 27, pp. 1545-1557).
- Braglia P., Percudani, R.& Dieci, G. (2005). Sequence context effects on oligo(dT) termination signal recognition by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III. *J Biol Chem*, 280(20), 19551-19562
- Brandsen J., Werten, S., van der Vliet, P.C., Meisterernst, M., Kroon, J.& Gros, P. (1997). C-terminal domain of transcription cofactor PC4 reveals dimeric ssDNA binding site *Nat Struct Biol* (Vol. 4, pp. 900-903).
- Broach J.R. (1991). RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway. *Trends Genet*, 7(1), 28-33
- Broek D., Toda, T., Michaeli, T., Levin, L., Birchmeier, C., Zoller, M., Powers, S.& Wigler, M. (1987). The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell*, 48(5), 789-799
- Buratowski S. (2005). Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination *Curr Opin Cell Biol* (Vol. 17, pp. 257-261).
- Cabarcas S., Jacob, J., Veras, I.& Schramm, L. (2008). Differential expression of the TFIIIB subunits Brf1 and Brf2 in cancer cells. *BMC Mol Biol*, 9, 74
- Cabarcas S.& Schramm, L. (2011). RNA polymerase III transcription in cancer: the BRF2 connection *Molecular Cancer* (Vol. 10, pp. 47).
- Cabarcas S., Watabe, K.& Schramm, L. (2010). Inhibition of U6 snRNA Transcription by PTEN *OnLine journal of biological sciences* (Vol. 10, pp. 114-125).
- Cabart P., Chew, H.K.& Murphy, S. (2004). BRCA1 cooperates with NUFIP and P-TEFb to activate transcription by RNA polymerase II *Oncogene* (Vol. 23, pp. 5316-5329).
- Cabart P., Lee, J.& Willis, I.M. (2008). Facilitated recycling protects human RNA polymerase III from repression by Maf1 in vitro *J Biol Chem* (Vol. 283, pp. 36108-36117).
- Cairns C.A.& White, R.J. (1998). p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription *EMBO J* (Vol. 17, pp. 3112-3123).
- Calvert G.R.& Dawes, I.W. (1984). Cell size control of development in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 312(5989), 61-63
- Calvo O.& Manley, J.L. (2001). Evolutionarily conserved interaction between CstF-64 and PC4 links transcription, polyadenylation, and termination *Mol Cell* (Vol. 7, pp. 1013-1023).
- Calvo O.& Manley, J.L. (2005). The transcriptional coactivator PC4/Sub1 has multiple functions in RNA polymerase II transcription *EMBO J* (Vol. 24, pp. 1009-1020).
- Camier S., Dechampsme, A.M.& Sentenac, A. (1995). The only essential function of TFIIIA in yeast is the transcription of 5S rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20), 9338-9342
- Campbell F.E., Jr.& Setzer, D.R. (1992). Transcription termination by RNA polymerase III: uncoupling of polymerase release from termination signal recognition. *Mol Cell Biol*, 12(5), 2260-2272
- Canella D., Praz, V., Reina, J.H., Cousin, P.& Hernandez, N. (2010). Defining the RNA polymerase III

- transcriptome: Genome-wide localization of the RNA polymerase III transcription machinery in human cells. *Genome Res*, 20(6), 710-721
- Carmo-Fonseca M., Mendes-Soares, L.& Campos, I. (2000). To be or not to be in the nucleolus *Nat Cell Biol* (Vol. 2, pp. E107-112).
- Carter R.& Drouin, G. (2010). The increase in the number of subunits in eukaryotic RNA polymerase III relative to RNA polymerase II is due to the permanent recruitment of general transcription factors. *Mol Biol Evol*, 27(5), 1035-1043
- Chaban Y., Ezeokonkwo, C., Chung, W.H., Zhang, F., Kornberg, R.D., Maier-Davis, B., Lorch, Y.& Asturias, F.J. (2008). Structure of a RSC-nucleosome complex and insights into chromatin remodeling *Nat Struct Mol Biol* (Vol. 15, pp. 1272-1277).
- Chan C.T., Dyavaiah, M., Demott, M., Taghizadeh, K., Dedon, P.& Begley, T.J. (2010). A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress *PLoS Genet* (Vol. 6, pp. e1001247).
- Chaussivert N., Conesa, C., Shaaban, S.& Sentenac, A. (1995). Complex interactions between yeast TFIIB and TFIIC. *J Biol Chem*, 270(25), 15353-15358
- Chedin S., Ferri, M.L., Peyroche, G., Andrau, J.C., Jourdain, S., Lefebvre, O., Werner, M., Carles, C.& Sentenac, A. (1998). The yeast RNA polymerase III transcription machinery: a paradigm for eukaryotic gene activation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 63, 381-389
- Chedin S., Riva, M., Schultz, P., Sentenac, A.& Carles, C. (1998). The RNA cleavage activity of RNA polymerase III is mediated by an essential TFIIIS-like subunit and is important for transcription termination. *Genes Dev*, 12(24), 3857-3871
- Chen J., Zheng, X.F., Brown, E.J.& Schreiber, S.L. (1995). Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(11), 4947-4951
- Chen W., Heierhorst, J., Brosius, J.& Tiedge, H. (1997). Expression of neural BC1 RNA: induction in murine tumours *Eur J Cancer* (Vol. 33, pp. 288-292).
- Chernyakov I., Whipple, J.M., Kotelawala, L., Grayhack, E.J.& Phizicky, E.M. (2008). Degradation of several hypomodified mature tRNA species in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by Met22 and the 5'-3' exonucleases Rat1 and Xrn1. *Genes Dev*, 22(10), 1369-1380
- Chesnokov I., Chu, W.M., Botchan, M.R.& Schmid, C.W. (1996). p53 inhibits RNA polymerase III-directed transcription in a promoter-dependent manner. *Mol Cell Biol*, 16(12), 7084-7088
- Cieśła M.& Boguta, M. (2008). Regulation of RNA polymerase III transcription by Maf1 protein *Acta Biochim Pol* (Vol. 55, pp. 215-225).
- Cieśła M., Towpik, J., Graczyk, D., Oficjalska-Pham, D., Harismendy, O., Suleau, A., Balicki, K., Conesa, C., Lefebvre, O.& Boguta, M. (2007). Maf1 is involved in coupling carbon metabolism to RNA polymerase III transcription *Mol Cell Biol* (Vol. 27, pp. 7693-7702).
- Clarke E.M., Peterson, C.L., Brainard, A.V.& Riggs, D.L. (1996). Regulation of the RNA polymerase I and III transcription systems in response to growth conditions *J Biol Chem* (Vol. 271, pp. 22189-22195).
- Colombo S., Ma, P., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., Nauwelaers, D., de Winde, J.H., Gorwa, M.F., Colavizza, D.& Thevelein, J.M. (1998). Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *EMBO J* (Vol. 17, pp. 3326-3341).
- Conesa C.& Acker, J. (2010). Sub1/PC4 a chromatin associated protein with multiple functions in

transcription *RNA biology* (Vol. 7).

- Cozzarelli N.R., Gerrard, S.P., Schlissel, M., Brown, D.D.& Bogenhagen, D.F. (1983). Purified RNA polymerase III accurately and efficiently terminates transcription of 5S RNA genes. *Cell*, 34(3), 829-835
- Cramer P. (2002). Multisubunit RNA polymerases *Curr Opin Struct Biol* (Vol. 12, pp. 89-97).
- Cramer P. (2006). Recent structural studies of RNA polymerases II and III. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 6), 1058-1061
- Cramer P., Bushnell, D.A.& Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*, 292(5523), 1863-1876
- Crespo J.L.& Hall, M.N. (2002). Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(4), 579-591, table of contents
- Crighton D., Woiwode, A., Zhang, C., Mandavia, N., Morton, J.P., Warnock, L.J., Milner, J., White, R.J.& Johnson, D.L. (2003). p53 represses RNA polymerase III transcription by targeting TBP and inhibiting promoter occupancy by TFIIB *EMBO J* (Vol. 22, pp. 2810-2820).
- Croce C.M. (2008). Oncogenes and cancer *N Engl J Med* (Vol. 358, pp. 502-511).
- Curry S.& Conte, M.R. (2006). A terminal affair: 3'-end recognition by the human La protein. *Trends Biochem Sci*, 31(6), 303-305
- Dammann R., Lucchini, R., Koller, T.& Sogo, J.M. (1993). Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Nucleic Acids Research* (Vol. 21, pp. 2331-2338).
- Das C., Hizume, K., Batta, K., Kumar, B.R., Gadad, S.S., Ganguly, S., Lorain, S., Verreault, A., Sadhale, P.P., Takeyasu, K.& Kundu, T.K. (2006). Transcriptional coactivator PC4, a chromatin-associated protein, induces chromatin condensation *Mol Cell Biol* (Vol. 26, pp. 8303-8315).
- Das C., Gadad, S.S.& Kundu, T.K. (2010). Human positive coactivator 4 controls heterochromatinization and silencing of neural gene expression by interacting with REST/NRSF and CoREST. *J Mol Biol*, 397(1), 1-12
- Davidson D. (1964). RNA synthesis in roots of *Vicia Faba*. *Exp Cell Res* (Vol. 35, pp. 317-325).
- Davis R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases *Cell* (Vol. 103, pp. 239-252).
- Day A., Schneider, C.& Schneider, B.L. (2004). Yeast cell synchronization *Methods Mol Biol* (Vol. 241, pp. 55-76).
- De Virgilio C.& Loewith, R. (2006). Cell growth control: little eukaryotes make big contributions *Oncogene* (Vol. 25, pp. 6392-6415).
- De Virgilio C.& Loewith, R. (2006). The TOR signalling network from yeast to man *Int J Biochem Cell Biol* (Vol. 38, pp. 1476-1481).
- Deprez E., Arrebola, R., Conesa, C.& Sentenac, A. (1999). A subunit of yeast TFIIC participates in the recruitment of TATA-binding protein. *Mol Cell Biol*, 19(12), 8042-8051
- DeRisi J.L., Iyer, V.R.& Brown, P.O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278(5338), 680-686
- Desai N., Lee, J., Upadhyaya, R., Chu, Y., Moir, R.D.& Willis, I.M. (2005). Two steps in Maf1-dependent repression of transcription by RNA polymerase III *J Biol Chem* (Vol. 280, pp. 6455-6462).
- Dezelee S., Wyers, F., Sentenac, A.& Fromageot, P. (1976). Two forms of RNA polymerase B in yeast. Proteolytic conversion in vitro of enzyme BI into BII. *Eur J Biochem*, 65(2), 543-552
- Di Como C.J.& Arndt, K.T. (1996). Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42

- with type 2A phosphatases *Genes & Development* (Vol. 10, pp. 1904-1916).
- Di Segni G., McConaughy, B.L., Shapiro, R.A., Aldrich, T.L. & Hall, B.D. (1993). TAP1, a yeast gene that activates the expression of a tRNA gene with a defective internal promoter *Mol Cell Biol* (Vol. 13, pp. 3424-3433).
- Dieci G., Duimio, L., Coda-Zabetta, F., Sprague, K.U. & Ottonello, S. (1993). A novel RNA polymerase III transcription factor fraction that is not required for template commitment. *J Biol Chem*, 268(15), 11199-11207
- Dieci G., Duimio, L., Peracchia, G. & Ottonello, S. (1995). Selective inactivation of two components of the multiprotein transcription factor TFIIB in cycloheximide growth-arrested yeast cells *J Biol Chem* (Vol. 270, pp. 13476-13482).
- Dieci G., Fiorino, G., Castelnuovo, M., Teichmann, M. & Pagano, A. (2007). The expanding RNA polymerase III transcriptome *Trends Genet* (Vol. 23, pp. 614-622).
- Dieci G., Ruotolo, R., Braglia, P., Carles, C., Carpentieri, A., Amoresano, A. & Ottonello, S. (2009). Positive modulation of RNA polymerase III transcription by ribosomal proteins *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 379, pp. 489-493).
- Dieci G. & Sentenac, A. (1996). Facilitated recycling pathway for RNA polymerase III. *Cell*, 84(2), 245-252
- Diribarne G. & Bensaude, O. (2009). 7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor. *RNA Biol*, 6(2), 122-128
- Downward J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy *Nat Rev Cancer* (Vol. 3, pp. 11-22).
- Ducrot C., Lefebvre, O., Landrieux, E., Guirouilh-Barbat, J., Sentenac, A. & Acker, J. (2006). Reconstitution of the yeast RNA polymerase III transcription system with all recombinant factors *J Biol Chem* (Vol. 281, pp. 11685-11692).
- Dumay H., Rubbi, L., Sentenac, A. & Marck, C. (1999). Interaction between yeast RNA polymerase III and transcription factor TFIIC via ABC10alpha and tau131 subunits. *J Biol Chem*, 274(47), 33462-33468
- Dumay-Odelot H., Acker, J., Arrebola, R., Sentenac, A. & Marck, C. (2002). Multiple roles of the tau131 subunit of yeast transcription factor IIIC (TFIIC) in TFIIB assembly. *Mol Cell Biol*, 22(1), 298-308
- Dumay-Odelot H., Durrieu-Gaillard, S., Da Silva, D., Roeder, R.G. & Teichmann, M. (2010). Cell growth- and differentiation-dependent regulation of RNA polymerase III transcription *Cell Cycle* (Vol. 9, pp. 3687-3699).
- Düvel K. & Broach, J.R. (2004). The role of phosphatases in TOR signaling in yeast *Curr Top Microbiol Immunol* (Vol. 279, pp. 19-38).
- Düvel K., Santhanam, A., Garrett, S., Schneper, L. & Broach, J.R. (2003). Multiple roles of Tap42 in mediating rapamycin-induced transcriptional changes in yeast *Mol Cell* (Vol. 11, pp. 1467-1478).
- Edgar B.A. & Schubiger, G. (1986). Parameters controlling transcriptional activation during early *Drosophila* development *Cell* (Vol. 44, pp. 871-877).
- Elion E.A. & Warner, J.R. (1984). The major promoter element of rRNA transcription in yeast lies 2 kb upstream. *Cell*, 39(3 Pt 2), 663-673
- Emili A., Schieltz, D.M., Yates, J.R. & Hartwell, L.H. (2001). Dynamic interaction of DNA damage checkpoint protein Rad53 with chromatin assembly factor Asf1 *Mol Cell* (Vol. 7, pp. 13-20).
- Engelke D.R., Ng, S.Y., Shastry, B.S. & Roeder, R.G. (1980). Specific interaction of a purified

- transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell*, 19(3), 717-728
- Engelman J.A., Luo, J.& Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism *Nat Rev Genet* (Vol. 7, pp. 606-619).
- Eriksson P., Biswas, D., Yu, Y., Stewart, J.M.& Stillman, D.J. (2004). TATA-binding protein mutants that are lethal in the absence of the Nhp6 high-mobility-group protein *Mol Cell Biol* (Vol. 24, pp. 6419-6429).
- Fairley J.A., Kantidakis, T., Kenneth, N.S., Intine, R.V., Maraia, R.J.& White, R.J. (2005). Human La is found at RNA polymerase III-transcribed genes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(51), 18350-18355
- Fairley J.A., Scott, P.H.& White, R.J. (2003). TFIIB is phosphorylated, disrupted and selectively released from tRNA promoters during mitosis in vivo *EMBO J* (Vol. 22, pp. 5841-5850).
- Fan H., Sakulich, A.L., Goodier, J.L., Zhang, X., Qin, J.& Maraia, R.J. (1997). Phosphorylation of the human La antigen on serine 366 can regulate recycling of RNA polymerase III transcription complexes. *Cell*, 88(5), 707-715
- Fan S., Zhang, M.Q.& Zhang, X. (2008). Histone methylation marks play important roles in predicting the methylation status of CpG islands *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 374, pp. 559-564).
- Felici F., Cesareni, G.& Hughes, J.M. (1989). The most abundant small cytoplasmic RNA of *Saccharomyces cerevisiae* has an important function required for normal cell growth. *Mol Cell Biol*, 9(8), 3260-3268
- Felton-Edkins Z., Fairley, J.A., Graham, E.L., Johnston, I.M., White, R.J.& Scott, P.H. (2003). The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIB *EMBO J* (Vol. 22, pp. 2422-2432).
- Felton-Edkins Z.A., Kenneth, N.S., Brown, T.R., Daly, N.L., Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N.& White, R.J. (2003). Direct regulation of RNA polymerase III transcription by RB, p53 and c-Myc *Cell Cycle* (Vol. 2, pp. 181-184).
- Felton-Edkins Z.A., Kondrashov, A., Karali, D., Fairley, J.A., Dawson, C.W., Arrand, J.R., Young, L.S.& White, R.J. (2006). Epstein-Barr virus induces cellular transcription factors to allow active expression of EBER genes by RNA polymerase III *J Biol Chem* (Vol. 281, pp. 33871-33880).
- Felton-Edkins Z.A.& White, R.J. (2002). Multiple mechanisms contribute to the activation of RNA polymerase III transcription in cells transformed by papovaviruses *J Biol Chem* (Vol. 277, pp. 48182-48191).
- Fernandez-Tornero C., Bottcher, B., Riva, M., Carles, C., Steuerwald, U., Ruigrok, R.W., Sentenac, A., Muller, C.W.& Schoehn, G. (2007). Insights into transcription initiation and termination from the electron microscopy structure of yeast RNA polymerase III. *Mol Cell*, 25(6), 813-823
- Ferrari R.& Dieci, G. (2008). The transcription reinitiation properties of RNA polymerase III in the absence of transcription factors. *Cell Mol Biol Lett*, 13(1), 112-118
- Ferrari R., Rivetti, C., Acker, J.& Dieci, G. (2004). Distinct roles of transcription factors TFIIB and TFIIC in RNA polymerase III transcription reinitiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(37), 13442-13447
- Ferri M.L., Peyroche, G., Siaut, M., Lefebvre, O., Carles, C., Conesa, C.& Sentenac, A. (2000). A novel subunit of yeast RNA polymerase III interacts with the TFIIB-related domain of TFIIB70. *Mol Cell Biol*, 20(2), 488-495
- Fingar D.C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E.& Blenis, J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev*, 16(12), 1472-1487

- Fink K.& Turnock, G. (1977). Synthesis of transfer RNA during the synchronous nuclear division cycle in *Physarum polycephalum* *Eur J Biochem* (Vol. 80, pp. 93-96).
- Flores A., Briand, J.F., Gadal, O., Andrau, J.C., Rubbi, L., Van Mullem, V., Boschiero, C., Goussot, M., Marck, C., Carles, C., Thuriaux, P., Sentenac, A.& Werner, M. (1999). A protein-protein interaction map of yeast RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(14), 7815-7820
- French S.L., Osheim, Y.N., Schneider, D.A., Sikes, M.L., Fernandez, C.F., Copela, L.A., Misra, V.A., Nomura, M., Wolin, S.L.& Beyer, A.L. (2008). Visual analysis of the yeast 5S rRNA gene transcriptome: regulation and role of La protein. *Mol Cell Biol*, 28(14), 4576-4587
- Fukuda A., Nakadai, T., Shimada, M., Tsukui, T., Matsumoto, M., Nogi, Y., Meisterernst, M.& Hisatake, K. (2004). Transcriptional coactivator PC4 stimulates promoter escape and facilitates transcriptional synergy by GAL4-VP16 *Mol Cell Biol* (Vol. 24, pp. 6525-6535).
- Gajda A., Towpik, J., Steuerwald, U., Müller, C.W., Lefebvre, O.& Boguta, M. (2010). Full repression of RNA polymerase III transcription requires interaction between two domains of its negative regulator Maf1 *J Biol Chem* (Vol. 285, pp. 35719-35727).
- Galdieri L., Mehrotra, S., Yu, S.& Vancura, A. (2010). Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase *OMICS: A Journal of Integrative Biology* (Vol. 14, pp. 629-638).
- García A., Rosonina, E., Manley, J.L.& Calvo, O. (2010). Sub1 globally regulates RNA polymerase II C-terminal domain phosphorylation *Mol Cell Biol* (Vol. 30, pp. 5180-5193).
- Gaskins C.J.& Hanas, J.S. (1990). Sequence variation in transcription factor IIIA. *Nucleic Acids Res*, 18(8), 2117-2123
- Ge H.& Roeder, R.G. (1994). Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes *Cell* (Vol. 78, pp. 513-523).
- Ge H., Zhao, Y., Chait, B.T.& Roeder, R.G. (1994). Phosphorylation negatively regulates the function of coactivator PC4 *Proc Natl Acad Sci USA* (Vol. 91, pp. 12691-12695).
- Geiduschek E.P.& Kassavetis, G.A. (2001). The RNA polymerase III transcription apparatus. *J Mol Biol*, 310(1), 1-26
- Geisberg J.V., Holstege, F.C., Young, R.A.& Struhl, K. (2001). Yeast NC2 associates with the RNA polymerase II preinitiation complex and selectively affects transcription in vivo. *Mol Cell Biol*, 21(8), 2736-2742
- Ghavidel A., Hockman, D.J.& Schultz, M.C. (1999). A review of progress towards elucidating the role of protein kinase CK2 in polymerase III transcription: regulation of the TATA binding protein *Mol Cell Biochem* (Vol. 191, pp. 143-148).
- Ghavidel A., Kislinger, T., Pogoutse, O., Sopko, R., Jurisica, I.& Emili, A. (2007). Impaired tRNA nuclear export links DNA damage and cell-cycle checkpoint *Cell* (Vol. 131, pp. 915-926).
- Ghavidel A.& Schultz, M.C. (1997). Casein kinase II regulation of yeast TFIIIB is mediated by the TATA-binding protein *Genes & Development* (Vol. 11, pp. 2780-2789).
- Ghavidel A.& Schultz, M.C. (2001). TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery *Cell* (Vol. 106, pp. 575-584).
- Ghavi-Helm Y., Michaut, M., Acker, J., Aude, J.C., Thuriaux, P., Werner, M.& Soutourina, J. (2008). Genome-wide location analysis reveals a role of TFIIIS in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev*, 22(14), 1934-1947
- Giuliodori S., Percudani, R., Braglia, P., Ferrari, R., Guffanti, E., Ottonello, S.& Dieci, G. (2003). A composite upstream sequence motif potentiates tRNA gene transcription in yeast *J Mol Biol* (Vol. 333, pp. 1-20).

- Goffeau A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. & Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes *Science* (Vol. 274, pp. 546, 563-547).
- Gokal P.K., Cavanaugh, A.H. & Thompson, E.A. (1986). The effects of cycloheximide upon transcription of rRNA, 5 S RNA, and tRNA genes *J Biol Chem* (Vol. 261, pp. 2536-2541).
- Gomez-Roman N., Grandori, C., Eisenman, R.N. & White, R.J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc *Nature* (Vol. 421, pp. 290-294).
- Goodfellow S.J., Graham, E.L., Kantidakis, T., Marshall, L., Coppins, B.A., Oficjalska-Pham, D., Gérard, M., Lefebvre, O. & White, R.J. (2008). Regulation of RNA polymerase III transcription by Maf1 in mammalian cells *J Mol Biol* (Vol. 378, pp. 481-491).
- Goodfellow S.J., Innes, F., Derblay, L.E., MacLellan, W.R., Scott, P.H. & White, R.J. (2006). Regulation of RNA polymerase III transcription during hypertrophic growth *EMBO J* (Vol. 25, pp. 1522-1533).
- Goodier J.L., Fan, H. & Maraia, R.J. (1997). A carboxy-terminal basic region controls RNA polymerase III transcription factor activity of human La protein. *Mol Cell Biol*, 17(10), 5823-5832
- Görner W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E.L., Ammerer, G., Ruis, H. & Schüller, C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor *EMBO J* (Vol. 21, pp. 135-144).
- Gottesfeld J.M., Johnson, D.L. & Nyborg, J.K. (1996). Transcriptional activation of RNA polymerase III-dependent genes by the human T-cell leukemia virus type 1 tax protein *Mol Cell Biol* (Vol. 16, pp. 1777-1785).
- Gottesfeld J.M., Wolf, V.J., Dang, T., Forbes, D.J. & Hartl, P. (1994). Mitotic repression of RNA polymerase III transcription in vitro mediated by phosphorylation of a TFIIIB component *Science* (Vol. 263, pp. 81-84).
- Gottlieb E. & Steitz, J.A. (1989). The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro. *EMBO J*, 8(3), 841-850
- Graczyk D., Debski, J., Muszyńska, G., Bretner, M., Lefebvre, O. & Boguta, M. (2011). Casein kinase II-mediated phosphorylation of general repressor Maf1 triggers RNA polymerase III activation *Proc Natl Acad Sci USA* (Vol. 108, pp. 4926-4931).
- Gray J.V., Petsko, G.A., Johnston, G.C., Ringe, D., Singer, R.A. & Werner-Washburne, M. (2004). "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae* *Microbiol Mol Biol Rev* (Vol. 68, pp. 187-206).
- Gronostajski R.M. (2000). Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene*, 249(1-2), 31-45
- Gross E., Goldberg, D. & Levitzki, A. (1992). Phosphorylation of the *S. cerevisiae* Cdc25 in response to glucose results in its dissociation from Ras. *Nature*, 360(6406), 762-765
- Gu W., Malik, S., Ito, M., Yuan, C.X., Fondell, J.D., Zhang, X., Martinez, E., Qin, J. & Roeder, R.G. (1999). A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation *Mol Cell* (Vol. 3, pp. 97-108).
- Guerrier-Takada C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. & Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35(3 Pt 2), 849-857
- Guffanti E., Percudani, R., Harismendy, O., Soutourina, J., Werner, M., Iacovella, M.G., Negri, R. & Dieci, G. (2006). Nucleosome depletion activates poised RNA polymerase III at unconventional transcription sites in *Saccharomyces cerevisiae* *J Biol Chem* (Vol. 281, pp. 29155-29164).

- Guo J., Bryan, B.A. & Polymenis, M. (2004). Nutrient-specific effects in the coordination of cell growth with cell division in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*, 182(4), 326-330
- Haeusler R.A. & Engelke, D.R. (2006). Spatial organization of transcription by RNA polymerase III *Nucleic Acids Research* (Vol. 34, pp. 4826-4836).
- Haeusler R.A., Pratt-Hyatt, M., Good, P.D., Gipson, T.A. & Engelke, D.R. (2008). Clustering of yeast tRNA genes is mediated by specific association of condensin with tRNA gene transcription complexes *Genes & Development* (Vol. 22, pp. 2204-2214).
- Han M. & Grunstein, M. (1988). Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell*, 55(6), 1137-1145
- Hanahan D. & Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer *Cell* (Vol. 100, pp. 57-70).
- Hanahan D. & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation *Cell* (Vol. 144, pp. 646-674).
- Hanas J.S., Bogenhagen, D.F. & Wu, C.W. (1984). Binding of *Xenopus* transcription factor A to 5S RNA and to single stranded DNA. *Nucleic Acids Res*, 12(6), 2745-2758
- Hanna D.E., Rethinaswamy, A. & Glover, C.V. (1995). Casein kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in *Saccharomyces cerevisiae* *J Biol Chem* (Vol. 270, pp. 25905-25914).
- Harismendy O., Gendrel, C.G., Soularue, P., Gidrol, X., Sentenac, A., Werner, M. & Lefebvre, O. (2003). Genome-wide location of yeast RNA polymerase III transcription machinery *EMBO J* (Vol. 22, pp. 4738-4747).
- Hartl P., Gottesfeld, J. & Forbes, D.J. (1993). Mitotic repression of transcription in vitro *J Cell Biol* (Vol. 120, pp. 613-624).
- Hartwell L.H. & Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events *Science* (Vol. 246, pp. 629-634).
- Haurie V., Durrieu-Gaillard, S., Dumay-Odelot, H., Da Silva, D., Rey, C., Prochazkova, M., Roeder, R.G., Besser, D. & Teichmann, M. (2010). Two isoforms of human RNA polymerase III with specific functions in cell growth and transformation *Proc Natl Acad Sci USA* (Vol. 107, pp. 4176-4181).
- Hay N. & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR *Genes & Development* (Vol. 18, pp. 1926-1945).
- He X., Khan, A.U., Cheng, H., Pappas, D.L., Hampsey, M. & Moore, C.L. (2003). Functional interactions between the transcription and mRNA 3' end processing machineries mediated by Ssu72 and Sub1 *Genes & Development* (Vol. 17, pp. 1030-1042).
- Heitman J., Movva, N.R. & Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253(5022), 905-909
- Helliwell S.B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R. & Hall, M.N. (1994). TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol Biol Cell*, 5(1), 105-118
- Henry N.L., Bushnell, D.A. & Kornberg, R.D. (1996). A yeast transcriptional stimulatory protein similar to human PC4 *J Biol Chem* (Vol. 271, pp. 21842-21847).
- Herman P.K. (2002). Stationary phase in yeast. *Curr Opin Microbiol*, 5(6), 602-607
- Hinnebusch A.G. & Natarajan, K. (2002). Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress *Eukaryotic Cell* (Vol. 1, pp. 22-32).

- Hirsch H.A., Jawdekar, G.W., Lee, K.A., Gu, L. & Henry, R.W. (2004). Distinct mechanisms for repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma tumor suppressor protein *Mol Cell Biol* (Vol. 24, pp. 5989-5999).
- Hockman D.J. & Schultz, M.C. (1996). Casein kinase II is required for efficient transcription by RNA polymerase III *Mol Cell Biol* (Vol. 16, pp. 892-898).
- Hohmann S., Krantz, M. & Nordlander, B. (2007). Yeast osmoregulation *Meth Enzymol* (Vol. 428, pp. 29-45).
- Hopper A.K. & Shaheen, H.H. (2008). A decade of surprises for tRNA nuclear-cytoplasmic dynamics. *Trends Cell Biol*, 18(3), 98-104
- Hopper A.K., Pai, D.A. & Engelke, D.R. (2010). Cellular dynamics of tRNAs and their genes. *FEBS Lett*, 584(2), 310-317
- Hsu P.P., Kang, S.A., Rameseder, J., Zhang, Y., Ottina, K.A., Lim, D., Peterson, T.R., Choi, Y., Gray, N.S., Yaffe, M.B., Marto, J.A. & Sabatini, D.M. (2011). The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling *Science* (Vol. 332, pp. 1317-1322).
- Hu F., Alcasabas, A.A. & Elledge, S.J. (2001). Asf1 links Rad53 to control of chromatin assembly *Genes & Development* (Vol. 15, pp. 1061-1066).
- Hu P., Samudre, K., Wu, S., Sun, Y. & Hernandez, N. (2004). CK2 phosphorylation of Bdp1 executes cell cycle-specific RNA polymerase III transcription repression *Mol Cell* (Vol. 16, pp. 81-92).
- Hu P., Wu, S. & Hernandez, N. (2003). A minimal RNA polymerase III transcription system from human cells reveals positive and negative regulatory roles for CK2 *Mol Cell* (Vol. 12, pp. 699-709).
- Hu P., Wu, S., Sun, Y., Yuan, C.C., Kobayashi, R., Myers, M.P. & Hernandez, N. (2002). Characterization of human RNA polymerase III identifies orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III subunits *Mol Cell Biol* (Vol. 22, pp. 8044-8055).
- Huang Y. & Maraia, R.J. (2001). Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human *Nucleic Acids Research* (Vol. 29, pp. 2675-2690).
- Huber A., Bodenmiller, B., Uotila, A., Stahl, M., Wanka, S., Gerrits, B., Aebersold, R. & Loewith, R. (2009). Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis *Genes & Development* (Vol. 23, pp. 1929-1943).
- Huet J., Conesa, C., Manaud, N., Chaussivert, N. & Sentenac, A. (1994). Interactions between yeast TFIIIB components. *Nucleic Acids Res*, 22(12), 2282-2288
- Huet J. & Sentenac, A. (1992). The TATA-binding protein participates in TFIIIB assembly on tRNA genes. *Nucleic Acids Res*, 20(24), 6451-6454
- Huibregtse J.M. & Engelke, D.R. (1989). Genomic footprinting of a yeast tRNA gene reveals stable complexes over the 5'-flanking region *Mol Cell Biol* (Vol. 9, pp. 3244-3252).
- Ishiguro A., Kassavetis, G.A. & Geiduschek, E.P. (2002). Essential roles of Bdp1, a subunit of RNA polymerase III initiation factor TFIIIB, in transcription and tRNA processing. *Mol Cell Biol*, 22(10), 3264-3275
- Jacob F. (2002). [The world of stem cells] *C R Biol* (Vol. 325, pp. 999-1002).
- Jarrous N. & Reiner, R. (2007). Human RNase P: a tRNA-processing enzyme and transcription factor. *Nucleic Acids Res*, 35(11), 3519-3524
- Jasiak A.J., Armache, K.J., Martens, B., Jansen, R.P. & Cramer, P. (2006). Structural biology of RNA polymerase III: subcomplex C17/25 X-ray structure and 11 subunit enzyme model. *Mol Cell*,

- Jiang Y. & Broach, J.R. (1999). Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast *EMBO J* (Vol. 18, pp. 2782-2792).
- Johnson S.A., Dubeau, L. & Johnson, D.L. (2008). Enhanced RNA polymerase III-dependent transcription is required for oncogenic transformation *J Biol Chem* (Vol. 283, pp. 19184-19191).
- Johnson S.A., Mandavia, N., Wang, H.D. & Johnson, D.L. (2000). Transcriptional regulation of the TATA-binding protein by Ras cellular signaling *Mol Cell Biol* (Vol. 20, pp. 5000-5009).
- Johnson S.S., Zhang, C., Fromm, J., Willis, I.M. & Johnson, D.L. (2007). Mammalian Maf1 is a negative regulator of transcription by all three nuclear RNA polymerases *Mol Cell* (Vol. 26, pp. 367-379).
- Johnson T.C. & Holland, J.J. (1965). Ribonucleic acid and protein synthesis in mitotic HeLa cells *J Cell Biol* (Vol. 27, pp. 565-574).
- Johnston G.C., Pringle, J.R. & Hartwell, L.H. (1977). Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Exp Cell Res* (Vol. 105, pp. 79-98).
- Johnston I.M., Allison, S.J., Morton, J.P., Schramm, L., Scott, P.H. & White, R.J. (2002). CK2 forms a stable complex with TFIIIB and activates RNA polymerase III transcription in human cells *Mol Cell Biol* (Vol. 22, pp. 3757-3768).
- Jonker H.R., Wechselberger, R.W., Boelens, R., Kaptein, R. & Folkers, G.E. (2006). The intrinsically unstructured domain of PC4 modulates the activity of the structured core through inter- and intramolecular interactions *Biochemistry* (Vol. 45, pp. 5067-5081).
- Jonker H.R., Wechselberger, R.W., Pinkse, M., Kaptein, R. & Folkers, G.E. (2006). Gradual phosphorylation regulates PC4 coactivator function *FEBS J* (Vol. 273, pp. 1430-1444).
- Kaiser K. & Meisterernst, M. (1996). The human general co-factors *Trends Biochem Sci* (Vol. 21, pp. 342-345).
- Kaiser K., Stelzer, G. & Meisterernst, M. (1995). The coactivator p15 (PC4) initiates transcriptional activation during TFIIA-TFIIID-promoter complex formation *EMBO J* (Vol. 14, pp. 3520-3527).
- Kamada Y., Jung, U.S., Piotrowski, J. & Levin, D.E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response *Genes & Development* (Vol. 9, pp. 1559-1571).
- Kannan P. & Tainsky, M.A. (1999). Coactivator PC4 mediates AP-2 transcriptional activity and suppresses ras-induced transformation dependent on AP-2 transcriptional interference *Mol Cell Biol* (Vol. 19, pp. 899-908).
- Kanojia D. & Vaidya, M.M. (2006). 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis *Oral Oncol* (Vol. 42, pp. 655-667).
- Kantidakis T., Ramsbottom, B.A., Birch, J.L., Dowding, S.N. & White, R.J. (2010). mTOR associates with TFIIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1 *Proc Natl Acad Sci USA* (Vol. 107, pp. 11823-11828).
- Kantidakis T. & White, R.J. (2010). Dr1 (NC2) is present at tRNA genes and represses their transcription in human cells. *Nucleic Acids Res*, 38(4), 1228-1239
- Karkusiewicz I., Turowski, T.W., Graczyk, D., Towpik, J., Dhungel, N., Hopper, A.K. & Boguta, M. (2011). Maf1, repressor of RNA polymerase III, indirectly affects tRNA processing. *J Biol Chem*
- Kassavetis G.A., Bartholomew, B., Blanco, J.A., Johnson, T.E. & Geiduschek, E.P. (1991). Two essential components of the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor TFIIIB: transcription and DNA-binding properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(16), 7308-7312

- Kassavetis G.A., Blanco, J.A., Johnson, T.E.& Geiduschek, E.P. (1992). Formation of open and elongating transcription complexes by RNA polymerase III. *J Mol Biol*, 226(1), 47-58
- Kassavetis G.A., Braun, B.R., Nguyen, L.H.& Geiduschek, E.P. (1990). S. cerevisiae TFIIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIIA and TFIIIC are assembly factors *Cell* (Vol. 60, pp. 235-245).
- Kassavetis G.A., Driscoll, R.& Geiduschek, E.P. (2006). Mapping the principal interaction site of the Brf1 and Bdp1 subunits of Saccharomyces cerevisiae TFIIIB. *J Biol Chem*, 281(20), 14321-14329
- Kassavetis G.A.& Geiduschek, E.P. (2006). Transcription factor TFIIIB and transcription by RNA polymerase III. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 6), 1082-1087
- Kassavetis G.A., Han, S., Naji, S.& Geiduschek, E.P. (2003). The role of transcription initiation factor IIIB subunits in promoter opening probed by photochemical cross-linking. *J Biol Chem*, 278(20), 17912-17917
- Kassavetis G.A., Joazeiro, C.A., Pisano, M., Geiduschek, E.P., Colbert, T., Hahn, S.& Blanco, J.A. (1992). The role of the TATA-binding protein in the assembly and function of the multisubunit yeast RNA polymerase III transcription factor, TFIIIB. *Cell*, 71(6), 1055-1064
- Kassavetis G.A., Prakash, P.& Shim, E. (2010). The C53/C37 subcomplex of RNA polymerase III lies near the active site and participates in promoter opening. *J Biol Chem*, 285(4), 2695-2706
- Kassavetis G.A.& Steiner, D.F. (2006). Nhp6 is a transcriptional initiation fidelity factor for RNA polymerase III transcription in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 281(11), 7445-7451
- Katz M.E.& McCormick, F. (1997). Signal transduction from multiple Ras effectors. *Curr Opin Genet Dev*, 7(1), 75-79
- Keller H.J., Romaniuk, P.J.& Gottesfeld, J.M. (1992). Interaction of Xenopus TFIIIC with the TFIIIA.5 S RNA gene complex. *J Biol Chem*, 267(25), 18190-18198
- Kenna M., Stevens, A., McCammon, M.& Douglas, M.G. (1993). An essential yeast gene with homology to the exonuclease-encoding XRN1/KEM1 gene also encodes a protein with exoribonuclease activity. *Mol Cell Biol*, 13(1), 341-350
- Kenneth N.S., Ramsbottom, B.A., Gomez-Roman, N., Marshall, L., Cole, P.A.& White, R.J. (2007). TRRAP and GCN5 are used by c-Myc to activate RNA polymerase III transcription *Proc Natl Acad Sci USA* (Vol. 104, pp. 14917-14922).
- Khoo B., Brophy, B.& Jackson, S.P. (1994). Conserved functional domains of the RNA polymerase III general transcription factor BRF. *Genes Dev*, 8(23), 2879-2890
- Kim J., Ljungdahl, P.O.& Fink, G.R. (1990). kem mutations affect nuclear fusion in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, 126(4), 799-812
- Kim S., Na, J.G., Hampsey, M.& Reinberg, D. (1997). The Dr1/DRAP1 heterodimer is a global repressor of transcription in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(3), 820-825
- Kim U.J., Han, M., Kayne, P.& Grunstein, M. (1988). Effects of histone H4 depletion on the cell cycle and transcription of Saccharomyces cerevisiae *EMBO J* (Vol. 7, pp. 2211-2219).
- Klekamp M.S.& Weil, P.A. (1982). Specific transcription of homologous class III genes in yeast-soluble cell-free extracts. *J Biol Chem*, 257(14), 8432-8441
- Knaus R., Pollock, R.& Guarente, L. (1996). Yeast SUB1 is a suppressor of TFIIIB mutations and has homology to the human co-activator PC4 *EMBO J* (Vol. 15, pp. 1933-1940).
- Koc A., Wheeler, L.J., Mathews, C.K.& Merrill, G.F. (2004). Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J Biol Chem*, 279(1), 223-230

- Kolitz S.E. & Lorsch, J.R. (2010). Eukaryotic initiator tRNA: finely tuned and ready for action *FEBS Lett* (Vol. 584, pp. 396-404).
- Kolonko E.M., Albaugh, B.N., Lindner, S.E., Chen, Y., Satyshur, K.A., Arnold, K.M., Kaufman, P.D., Keck, J.L. & Denu, J.M. (2010). Catalytic activation of histone acetyltransferase Rtt109 by a histone chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(47), 20275-20280
- Kornberg R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA *Science* (Vol. 184, pp. 868-871).
- Kornberg R.D. (2007). The molecular basis of eukaryotic transcription *Proc Natl Acad Sci USA* (Vol. 104, pp. 12955-12961).
- Koyama H., Sumiya, E., Nagata, M., Ito, T. & Sekimizu, K. (2008). Transcriptional repression of the IMD2 gene mediated by the transcriptional co-activator Sub1 *Genes Cells* (Vol. 13, pp. 1113-1126).
- Kretschmar M., Kaiser, K., Lottspeich, F. & Meisterernst, M. (1994). A novel mediator of class II gene transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators *Cell* (Vol. 78, pp. 525-534).
- Kruppa M., Moir, R.D., Kolodrubetz, D. & Willis, I.M. (2001). Nhp6, an HMG1 protein, functions in SNR6 transcription by RNA polymerase III in *S. cerevisiae* *Mol Cell* (Vol. 7, pp. 309-318).
- Kruse J.P. & Gu, W. (2009). Modes of p53 regulation *Cell* (Vol. 137, pp. 609-622).
- Kumar B.R., Swaminathan, V., Banerjee, S. & Kundu, T.K. (2001). p300-mediated acetylation of human transcriptional coactivator PC4 is inhibited by phosphorylation. *J Biol Chem*, 276(20), 16804-16809
- Kunkel G.R., Cheung, T.C., Miyake, J.H., Urso, O., McNamara-Schroeder, K.J. & Stumph, W.E. (1996). Identification of a SPH element in the distal region of a human U6 small nuclear RNA gene promoter and characterization of the SPH binding factor in HeLa cell extracts. *Gene Expr*, 6(2), 59-72
- Kunkel G.R., Maser, R.L., Calvet, J.P. & Pederson, T. (1986). U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(22), 8575-8579
- Kuranda K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G. & François, J. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways *Mol Microbiol* (Vol. 61, pp. 1147-1166).
- Landrieux E., Alic, N., Ducrot, C., Acker, J., Riva, M. & Carles, C. (2006). A subcomplex of RNA polymerase III subunits involved in transcription termination and reinitiation. *EMBO J*, 25(1), 118-128
- Lane L.A., Fernandez-Tornero, C., Zhou, M., Morgner, N., Ptchelkine, D., Steuerwald, U., Politis, A., Lindner, D., Gvozdenovic, J., Gavin, A.C., Muller, C.W. & Robinson, C.V. (2011). Mass spectrometry reveals stable modules in holo and apo RNA polymerases I and III. *Structure*, 19(1), 90-100
- Larminie C.G., Cairns, C.A., Mital, R., Martin, K., Kouzarides, T., Jackson, S.P. & White, R.J. (1997). Mechanistic analysis of RNA polymerase III regulation by the retinoblastoma protein. *EMBO J*, 16(8), 2061-2071
- Larminie C.G., Sutcliffe, J.E., Tosh, K., Winter, A.G., Felton-Edkins, Z.A. & White, R.J. (1999). Activation of RNA polymerase III transcription in cells transformed by simian virus 40 *Mol Cell Biol* (Vol. 19, pp. 4927-4934).
- Lee J., Moir, R.D. & Willis, I.M. (2009). Regulation of RNA polymerase III transcription involves SCH9-

- dependent and SCH9-independent branches of the target of rapamycin (TOR) pathway *J Biol Chem* (Vol. 284, pp. 12604-12608).
- Lee S.H., Kwong, A.D., Pan, Z.Q. & Hurwitz, J. (1991). Studies on the activator 1 protein complex, an accessory factor for proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA polymerase delta *J Biol Chem* (Vol. 266, pp. 594-602).
- Lefebvre O., Ruth, J. & Sentenac, A. (1994). A mutation in the largest subunit of yeast TFIIC affects tRNA and 5 S RNA synthesis. Identification of two classes of suppressors. *J Biol Chem*, 269(37), 23374-23381
- Lewis B.A., Sims, R.J., Lane, W.S. & Reinberg, D. (2005). Functional characterization of core promoter elements: DPE-specific transcription requires the protein kinase CK2 and the PC4 coactivator *Mol Cell* (Vol. 18, pp. 471-481).
- Li B., Carey, M. & Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription *Cell* (Vol. 128, pp. 707-719).
- Li B. & Warner, J.R. (1996). Mutation of the Rab6 homologue of *Saccharomyces cerevisiae*, YPT6, inhibits both early Golgi function and ribosome biosynthesis *J Biol Chem* (Vol. 271, pp. 16813-16819).
- Li Y., Moir, R.D., Sethy-Coraci, I.K., Warner, J.R. & Willis, I.M. (2000). Repression of ribosome and tRNA synthesis in secretion-defective cells is signaled by a novel branch of the cell integrity pathway *Mol Cell Biol* (Vol. 20, pp. 3843-3851).
- Lin-Marq N. & Clarkson, S.G. (1998). Efficient synthesis, termination and release of RNA polymerase III transcripts in *Xenopus* extracts depleted of La protein. *EMBO J*, 17(7), 2033-2041
- Listerman I., Bledau, A.S., Grishina, I. & Neugebauer, K.M. (2007). Extragenic accumulation of RNA polymerase II enhances transcription by RNA polymerase III *PLoS Genet* (Vol. 3, pp. e212).
- Litchfield D.W. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death *Biochem J* (Vol. 369, pp. 1-15).
- Lobo S.M., Tanaka, M., Sullivan, M.L. & Hernandez, N. (1992). A TBP complex essential for transcription from TATA-less but not TATA-containing RNA polymerase III promoters is part of the TFIIB fraction. *Cell*, 71(6), 1029-1040
- Lockwood W.W., Chari, R., Coe, B.P., Thu, K.L., Garnis, C., Malloff, C.A., Campbell, J., Williams, A.C., Hwang, D., Zhu, C.Q., Buys, T.P., Yee, J., English, J.C., Macaulay, C., Tsao, M.S., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Lam, S. & Lam, W.L. (2010). Integrative genomic analyses identify BRF2 as a novel lineage-specific oncogene in lung squamous cell carcinoma *PLoS Med* (Vol. 7, pp. e1000315).
- Loewith R. (2011). A brief history of TOR *Biochem Soc Trans* (Vol. 39, pp. 437-442).
- Loewith R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P. & Hall, M.N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*, 10(3), 457-468
- Long K.S., Cedervall, T., Walch-Solimena, C., Noe, D.A., Huddleston, M.J., Annan, R.S. & Wolin, S.L. (2001). Phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* La protein does not appear to be required for its functions in tRNA maturation and nascent RNA stabilization. *RNA*, 7(11), 1589-1602
- Long R.M. & McNally, M.T. (2003). mRNA decay: x (XRN1) marks the spot. *Mol Cell*, 11(5), 1126-1128
- Longtine M.S., McKenzie, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. & Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae* *Yeast* (Vol. 14, pp. 953-961).

- Lopez S., Livingstone-Zatchej, M., Jourdain, S., Thoma, F., Sentenac, A. & Marsolier, M.C. (2001). High-mobility-group proteins NHP6A and NHP6B participate in activation of the RNA polymerase III SNR6 gene *Mol Cell Biol* (Vol. 21, pp. 3096-3104).
- Lorenzen K., Vannini, A., Cramer, P. & Heck, A.J. (2007). Structural biology of RNA polymerase III: mass spectrometry elucidates subcomplex architecture. *Structure*, 15(10), 1237-1245
- Luo J., Manning, B.D. & Cantley, L.C. (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell*, 4(4), 257-262
- Mahapatra S., Dewari, P.S., Bhardwaj, A. & Bhargava, P. (2011). Yeast H2A.Z, FACT complex and RSC regulate transcription of tRNA gene through differential dynamics of flanking nucleosomes *Nucleic Acids Research* (Vol. 39, pp. 4023-4034).
- Malik S., Guermah, M. & Roeder, R.G. (1998). A dynamic model for PC4 coactivator function in RNA polymerase II transcription *Proc Natl Acad Sci USA* (Vol. 95, pp. 2192-2197).
- Mamane Y., Petroulakis, E., Rong, L., Yoshida, K., Ler, L.W. & Sonenberg, N. (2004). eIF4E--from translation to transformation *Oncogene* (Vol. 23, pp. 3172-3179).
- Manaud N., Arrebola, R., Buffin-Meyer, B., Lefebvre, O., Voss, H., Riva, M., Conesa, C. & Sentenac, A. (1998). A chimeric subunit of yeast transcription factor IIIC forms a subcomplex with tau95. *Mol Cell Biol*, 18(6), 3191-3200
- Mann C., Micouin, J.Y., Chiannikulchai, N., Treich, I., Buhler, J.M. & Sentenac, A. (1992). RPC53 encodes a subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase C (III) whose inactivation leads to a predominantly G1 arrest *Mol Cell Biol* (Vol. 12, pp. 4314-4326).
- Manzoni R., Montani, F., Visintin, C., Caudron, F., Ciliberto, A. & Visintin, R. (2010). Oscillations in Cdc14 release and sequestration reveal a circuit underlying mitotic exit. *J Cell Biol*, 190(2), 209-222
- Maraia R.J. (1996). Transcription termination factor La is also an initiation factor for RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(8), 3383-3387
- Maraia R.J. & Intine, R.V. (2002). La protein and its associated small nuclear and nucleolar precursor RNAs. *Gene Expr*, 10(1-2), 41-57
- Maraia R.J., Kenan, D.J. & Keene, J.D. (1994). Eukaryotic transcription termination factor La mediates transcript release and facilitates reinitiation by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol*, 14(3), 2147-2158
- Margottin F., Dujardin, G., Gerard, M., Egly, J.M., Huet, J. & Sentenac, A. (1991). Participation of the TATA factor in transcription of the yeast U6 gene by RNA polymerase C. *Science*, 251(4992), 424-426
- Markman B., Dienstmann, R. & Tabernero, J. (2010). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs *Oncotarget* (Vol. 1, pp. 530-543).
- Marshall L. (2008). Elevated RNA polymerase III transcription drives proliferation and oncogenic transformation *Cell Cycle* (Vol. 7, pp. 3327-3329).
- Marshall L. & White, R.J. (2008). Non-coding RNA production by RNA polymerase III is implicated in cancer *Nat Rev Cancer* (Vol. 8, pp. 911-914).
- Martin M.P., Gerlach, V.L. & Brow, D.A. (2001). A novel upstream RNA polymerase III promoter element becomes essential when the chromatin structure of the yeast U6 RNA gene is altered. *Mol Cell Biol*, 21(19), 6429-6439
- Marzouki N., Camier, S., Ruet, A., Moenne, A. & Sentenac, A. (1986). Selective proteolysis defines two DNA binding domains in yeast transcription factor tau. *Nature*, 323(6084), 176-178

- Matsuzaki H., Kassavetis, G.A.& Geiduschek, E.P. (1994). Analysis of RNA chain elongation and termination by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III. *J Mol Biol*, 235(4), 1173-1192
- Mavrich T.N., Ioshikhes, I.P., Venters, B.J., Jiang, C., Tomsho, L.P., Qi, J., Schuster, S.C., Albert, I.& Pugh, B.F. (2008). A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome *Genome Research* (Vol. 18, pp. 1073-1083).
- Mayan M.& Aragón, L. (2010). Cis-interactions between non-coding ribosomal spacers dependent on RNAP-II separate RNAP-I and RNAP-III transcription domains *Cell Cycle* (Vol. 9, pp. 4328-4337).
- McCulloch V., Hardin, P., Peng, W., Ruppert, J.M.& Lobo-Ruppert, S.M. (2000). Alternatively spliced hBRF variants function at different RNA polymerase III promoters. *EMBO J*, 19(15), 4134-4143
- McStay B.& Grummt, I. (2008). The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology *Annu Rev Cell Dev Biol* (Vol. 24, pp. 131-157).
- Meissner W., Holland, R., Waldschmidt, R.& Seifart, K.H. (1993). Transcription factor IIA stimulates the expression of classical polIII-genes. *Nucleic Acids Res*, 21(4), 1013-1018
- Meissner W., Thomae, R.& Seifart, K.H. (2002). The activity of transcription factor IIC1 is impaired during differentiation of F9 cells *J Biol Chem* (Vol. 277, pp. 7148-7156).
- Melo J.& Toczyski, D. (2002). A unified view of the DNA-damage checkpoint *Curr Opin Cell Biol* (Vol. 14, pp. 237-245).
- Merino A., Madden, K.R., Lane, W.S., Champoux, J.J.& Reinberg, D. (1993). DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription *Nature* (Vol. 365, pp. 227-232).
- Michels A.A., Robitaille, A.M., Buczynski-Ruchonnet, D., Hodroj, W., Reina, J.H., Hall, M.N.& Hernandez, N. (2010). mTORC1 directly phosphorylates and regulates human MAF1 *Mol Cell Biol* (Vol. 30, pp. 3749-3757).
- Mizuta K.& Warner, J.R. (1994). Continued functioning of the secretory pathway is essential for ribosome synthesis *Mol Cell Biol* (Vol. 14, pp. 2493-2502).
- Moir R.D., Lee, J., Haeusler, R.A., Desai, N., Engelke, D.R.& Willis, I.M. (2006). Protein kinase A regulates RNA polymerase III transcription through the nuclear localization of Maf1 *Proc Natl Acad Sci USA* (Vol. 103, pp. 15044-15049).
- Moir R.D.& Willis, I.M. (2004). Tetratricopeptide repeats of Tfc4 and a limiting step in the assembly of the initiation factor TFIIIB. *Adv Protein Chem*, 67, 93-121
- Moqtaderi Z.& Struhl, K. (2004). Genome-wide occupancy profile of the RNA polymerase III machinery in *Saccharomyces cerevisiae* reveals loci with incomplete transcription complexes *Mol Cell Biol* (Vol. 24, pp. 4118-4127).
- Moqtaderi Z., Wang, J., Raha, D., White, R.J., Snyder, M., Weng, Z.& Struhl, K. (2010). Genomic binding profiles of functionally distinct RNA polymerase III transcription complexes in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 17(5), 635-640
- Morse R.H. (1989). Nucleosomes inhibit both transcriptional initiation and elongation by RNA polymerase III in vitro *EMBO J* (Vol. 8, pp. 2343-2351).
- Morse R.H., Roth, S.Y.& Simpson, R.T. (1992). A transcriptionally active tRNA gene interferes with nucleosome positioning in vivo *Mol Cell Biol* (Vol. 12, pp. 4015-4025).
- Morton J.P., Kantidakis, T.& White, R.J. (2007). RNA polymerase III transcription is repressed in response to the tumour suppressor ARF *Nucleic Acids Research* (Vol. 35, pp. 3046-3052).
- Mortusewicz O., Roth, W., Li, N., Cardoso, M.C., Meisterernst, M.& Leonhardt, H. (2008). Recruitment of RNA polymerase II cofactor PC4 to DNA damage sites *J Cell Biol* (Vol. 183, pp. 769-776).

- Mousson F., Ochsenbein, F.& Mann, C. (2007). The histone chaperone Asf1 at the crossroads of chromatin and DNA checkpoint pathways *Chromosoma* (Vol. 116, pp. 79-93).
- Mylona A., Fernandez-Tornero, C., Legrand, P., Haupt, M., Sentenac, A., Acker, J.& Muller, C.W. (2006). Structure of the tau60/Delta tau91 subcomplex of yeast transcription factor IIIc: insights into preinitiation complex assembly. *Mol Cell*, 24(2), 221-232
- Myslinski E., Krol, A.& Carbon, P. (1998). ZNF76 and ZNF143 are two human homologs of the transcriptional activator Staf. *J Biol Chem*, 273(34), 21998-22006
- Nanduri J.& Tartakoff, A.M. (2001). The arrest of secretion response in yeast: signaling from the secretory path to the nucleus via Wsc proteins and Pkc1p *Mol Cell* (Vol. 8, pp. 281-289).
- Nath K.& Bollon, A.P. (1977). Organization of the yeast ribosomal RNA gene cluster via cloning and restriction analysis. *J Biol Chem*, 252(18), 6562-6571
- Nebenführ A., Ritzenthaler, C.& Robinson, D.G. (2002). Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion *Plant Physiology* (Vol. 130, pp. 1102-1108).
- Nechaev S.& Adelman, K. (2011). Pol II waiting in the starting gates: Regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochim Biophys Acta*, 1809(1), 34-45
- Newport J.W.& Kirschner, M.W. (1984). Regulation of the cell cycle during early Xenopus development *Cell* (Vol. 37, pp. 731-742).
- Ng H.H., Robert, F., Young, R.A.& Struhl, K. (2002). Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex *Genes & Development* (Vol. 16, pp. 806-819).
- Nguyen V.C., Clelland, B.W., Hockman, D.J., Kujat-Choy, S.L., Mewhort, H.E.& Schultz, M.C. (2010). Replication stress checkpoint signaling controls tRNA gene transcription *Nat Struct Mol Biol* (Vol. 17, pp. 976-981).
- Nissen P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B.& Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 289(5481), 920-930
- Nolte R.T., Conlin, R.M., Harrison, S.C.& Brown, R.S. (1998). Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 2938-2943
- Oficjalska-Pham D., Harismendy, O., Smagowicz, W.J., Gonzalez de Peredo, A., Boguta, M., Sentenac, A.& Lefebvre, O. (2006). General repression of RNA polymerase III transcription is triggered by protein phosphatase type 2A-mediated dephosphorylation of Maf1 *Mol Cell* (Vol. 22, pp. 623-632).
- Oler A.J., Alla, R.K., Roberts, D.N., Wong, A., Hollenhorst, P.C., Chandler, K.J., Cassidy, P.A., Nelson, C.A., Hagedorn, C.H., Graves, B.J.& Cairns, B. (2010). Human RNA polymerase III transcriptomes and relationships to Pol II promoter chromatin and enhancer-binding factors *Nat Struct Mol Biol* (Vol. 17, pp. 620-628).
- Orphanides G., Lagrange, T.& Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev*, 10(21), 2657-2683
- Orphanides G., LeRoy, G., Chang, C.H., Luse, D.S.& Reinberg, D. (1998). FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes *Cell* (Vol. 92, pp. 105-116).
- Pagano A., Castelnuovo, M., Tortelli, F., Ferrari, R., Dieci, G.& Cancedda, R. (2007). New small nuclear RNA gene-like transcriptional units as sources of regulatory transcripts *PLoS Genet* (Vol. 3, pp. e1).
- Pan Z.Q., Ge, H., Amin, A.A.& Hurwitz, J. (1996). Transcription-positive cofactor 4 forms complexes with HSSB (RPA) on single-stranded DNA and influences HSSB-dependent enzymatic synthesis

- of simian virus 40 DNA *J Biol Chem* (Vol. 271, pp. 22111-22116).
- Pannone B.K., Xue, D.& Wolin, S.L. (1998). A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. *EMBO J*, 17(24), 7442-7453
- Parnell T.J., Huff, J.T.& Cairns, B. (2008). RSC regulates nucleosome positioning at Pol II genes and density at Pol III genes *EMBO J* (Vol. 27, pp. 100-110).
- Paule M.R.& White, R.J. (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III *Nucleic Acids Res* (Vol. 28, pp. 1283-1298).
- Percudani R., Pavesi, A.& Ottonello, S. (1997). Transfer RNA gene redundancy and translational selection in *Saccharomyces cerevisiae* *J Mol Biol* (Vol. 268, pp. 322-330).
- Phizicky E.M.& Hopper, A.K. (2010). tRNA biology charges to the front *Genes & Development* (Vol. 24, pp. 1832-1860).
- Pijnappel W.W., Schaft, D., Roguev, A., Shevchenko, A., Tekotte, H., Wilm, M., Rigaut, G., Seraphin, B., Aasland, R.& Stewart, A.F. (2001). The *S. cerevisiae* SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Genes Dev*, 15(22), 2991-3004
- Pjanic M., Pjanic, P., Schmid, C., Ambrosini, G., Gaussin, A., Plasari, G., Mazza, C., Bucher, P.& Mermod, N. (2011). Nuclear factor I revealed as family of promoter binding transcription activators. *BMC Genomics*, 12, 181
- Pluta K., Lefebvre, O., Martin, N.C., Smagowicz, W.J., Stanford, D.R., Ellis, S.R., Hopper, A.K., Sentenac, A.& Boguta, M. (2001). Maf1p, a negative effector of RNA polymerase III in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol* (Vol. 21, pp. 5031-5040).
- Powers T., Dilova, I., Chen, C.Y.& Wedaman, K. (2004). Yeast TOR signaling: a mechanism for metabolic regulation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 279, 39-51
- Poznic M. (2009). Retinoblastoma protein: a central processing unit *J Biosci* (Vol. 34, pp. 305-312).
- Prescott D.M.& Bender M.A. (1962). Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells. *Exp Cell Res* (Vol. 26, pp. 260-268).
- Prydz K., Dick, G.& Tveit, H. (2008). How Many Ways Through the Golgi Maze? *Traffic* (Vol. 9, pp. 299-304).
- Qiu H., Eifert, J., Wacheul, L., Thiry, M., Berger, A.C., Jakovljevic, J., Woolford, J.L., Jr., Corbett, A.H., Lafontaine, D.L., Terns, R.M.& Terns, M.P. (2008). Identification of genes that function in the biogenesis and localization of small nucleolar RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 28(11), 3686-3699
- Qiu H., Hu, C., Anderson, J., Björk, G.R., Sarkar, S., Hopper, A.K.& Hinnebusch, A.G. (2000). Defects in tRNA processing and nuclear export induce GCN4 translation independently of phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 *Mol Cell Biol* (Vol. 20, pp. 2505-2516).
- Raha D., Wang, Z., Moqtaderi, Z., Wu, L., Zhong, G., Gerstein, M., Struhl, K.& Snyder, M. (2010). Close association of RNA polymerase II and many transcription factors with Pol III genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(8), 3639-3644
- Reina J.H., Azzouz, T.N.& Hernandez, N. (2006). Maf1, a new player in the regulation of human RNA polymerase III transcription *PLoS ONE* (Vol. 1, pp. e134).
- Reiner R., Ben-Asouli, Y., Krilovetzky, I.& Jarrous, N. (2006). A role for the catalytic ribonucleoprotein RNase P in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev*, 20(12), 1621-1635

- Reinisch K.M.& Wolin, S.L. (2007). Emerging themes in non-coding RNA quality control *Curr Opin Struct Biol* (Vol. 17, pp. 209-214).
- Reinke A., Anderson, S., McCaffery, J.M., Yates, J., 3rd, Aronova, S., Chu, S., Fairclough, S., Iverson, C., Wedaman, K.P.& Powers, T. (2004). TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 279(15), 14752-14762
- Rep M., Albertyn, J., Thevelein, J.M., Prior, B.A.& Hohmann, S. (1999). Different signalling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae* *Microbiology (Reading, Engl)* (Vol. 145 ( Pt 3), pp. 715-727).
- Rep M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J.M., Hohmann, S., Ammerer, G.& Ruis, H. (1999). Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p *Mol Cell Biol* (Vol. 19, pp. 5474-5485).
- Richard P.& Manley, J.L. (2009). Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes Dev*, 23(11), 1247-1269
- Rincon J.C., Engler, S.K., Hargrove, B.W.& Kunkel, G.R. (1998). Molecular cloning of a cDNA encoding human SPH-binding factor, a conserved protein that binds to the enhancer-like region of the U6 small nuclear RNA gene promoter. *Nucleic Acids Res*, 26(21), 4846-4852
- Rinke J.& Steitz, J.A. (1982). Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell*, 29(1), 149-159
- Roberts D.N., Stewart, A.J., Huff, J.T.& Cairns, B. (2003). The RNA polymerase III transcriptome revealed by genome-wide localization and activity-occupancy relationships *Proc Natl Acad Sci USA* (Vol. 100, pp. 14695-14700).
- Roberts D.N., Wilson, B., Huff, J.T., Stewart, A.J.& Cairns, B. (2006). Dephosphorylation and genome-wide association of Maf1 with Pol III-transcribed genes during repression *Mol Cell* (Vol. 22, pp. 633-644).
- Rodriguez-Viciano P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D.& Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras *Nature* (Vol. 370, pp. 527-532).
- Rohde J., Heitman, J.& Cardenas, M.E. (2001). The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J Biol Chem*, 276(13), 9583-9586
- Rohde J.R., Bastidas, R., Puria, R.& Cardenas, M.E. (2008). Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae* *Curr Opin Microbiol* (Vol. 11, pp. 153-160).
- Rollins J., Veras, I., Cabarcas, S., Willis, I.& Schramm, L. (2007). Human Maf1 negatively regulates RNA polymerase III transcription via the TFIIB family members Brf1 and Brf2 *Int J Biol Sci* (Vol. 3, pp. 292-302).
- Rosen E.M., Fan, S.& Ma, Y. (2006). BRCA1 regulation of transcription *Cancer Lett* (Vol. 236, pp. 175-185).
- Rosonina E., Willis, I.M.& Manley, J.L. (2009). Sub1 functions in osmoregulation and in transcription by both RNA polymerases II and III *Mol Cell Biol* (Vol. 29, pp. 2308-2321).
- Rothfels K., Rowland, O.& Segall, J. (2007). Zinc fingers 1 and 7 of yeast TFIIIA are essential for assembly of a functional transcription complex on the 5 S RNA gene. *Nucleic Acids Res*, 35(14), 4869-4881
- Ruet A., Camier, S., Smagowicz, W., Sentenac, A.& Fromageot, P. (1984). Isolation of a class C transcription factor which forms a stable complex with tRNA genes. *EMBO J*, 3(2), 343-350

- Ruth J., Conesa, C., Dieci, G., Lefebvre, O., Dusterhoft, A., Ottonello, S. & Sentenac, A. (1996). A suppressor of mutations in the class III transcription system encodes a component of yeast TFIIB. *EMBO J*, 15(8), 1941-1949
- Santhanam A., Hartley, A., Düvel, K., Broach, J.R. & Garrett, S. (2004). PP2A phosphatase activity is required for stress and Tor kinase regulation of yeast stress response factor Msn2p *Eukaryotic Cell* (Vol. 3, pp. 1261-1271).
- Sarbassov D.D., Ali, S.M. & Sabatini, D.M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway *Curr Opin Cell Biol* (Vol. 17, pp. 596-603).
- Sarbassov D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. & Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex *Science* (Vol. 307, pp. 1098-1101).
- Schaub M., Krol, A. & Carbon, P. (1999). Flexible zinc finger requirement for binding of the transcriptional activator staf to U6 small nuclear RNA and tRNA(Sec) promoters. *J Biol Chem*, 274(34), 24241-24249
- Schaub M., Myslinski, E., Krol, A. & Carbon, P. (1999). Maximization of selenocysteine tRNA and U6 small nuclear RNA transcriptional activation achieved by flexible utilization of a Staf zinc finger. *J Biol Chem*, 274(35), 25042-25050
- Schaub M., Myslinski, E., Schuster, C., Krol, A. & Carbon, P. (1997). Staf, a promiscuous activator for enhanced transcription by RNA polymerases II and III. *EMBO J*, 16(1), 173-181
- Schramm L. & Hernandez, N. (2002). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters *Genes & Development* (Vol. 16, pp. 2593-2620).
- Schroder O., Bryant, G.O., Geiduschek, E.P., Berk, A.J. & Kassavetis, G.A. (2003). A common site on TBP for transcription by RNA polymerases II and III. *EMBO J*, 22(19), 5115-5124
- Schultz P., Marzouki, N., Marck, C., Ruet, A., Oudet, P. & Sentenac, A. (1989). The two DNA-binding domains of yeast transcription factor tau as observed by scanning transmission electron microscopy. *EMBO J*, 8(12), 3815-3824
- Schuster C., Myslinski, E., Krol, A. & Carbon, P. (1995). Staf, a novel zinc finger protein that activates the RNA polymerase III promoter of the selenocysteine tRNA gene. *EMBO J*, 14(15), 3777-3787
- Scott P.H., Cairns, C.A., Sutcliffe, J.E., Alzuhherri, H.M., McLees, A., Winter, A.G. & White, R.J. (2001). Regulation of RNA polymerase III transcription during cell cycle entry *J Biol Chem* (Vol. 276, pp. 1005-1014).
- Sebastian J., Mian, F. & Halvorson, H.O. (1973). Effect of the growth rate on the level of the DNA-dependent RNA polymerases in *Saccharomyces cerevisiae* *FEBS Lett* (Vol. 34, pp. 159-162).
- Segal E., Shapira, M., Regev, A., Pe'er, D., Botstein, D., Koller, D. & Friedman, N. (2003). Module networks: Identifying regulatory modules and their condition-specific regulators for gene expression data *Nat. Genet.* (Vol. 34, pp. 166-176).
- Segall J., Matsui, T. & Roeder, R.G. (1980). Multiple factors are required for the accurate transcription of purified genes by RNA polymerase III. *J Biol Chem*, 255(24), 11986-11991
- Sehgal S.N., Baker, H. & Vezina, C. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*, 28(10), 727-732
- Sethy I., Moir, R.D., Librizzi, M. & Willis, I.M. (1995). In vitro evidence for growth regulation of tRNA gene transcription in yeast. A role for transcription factor (TF) IIB70 and TFIIC *J Biol Chem* (Vol. 270, pp. 28463-28470).
- Shatkin A.J. & Manley, J.L. (2000). The ends of the affair: capping and polyadenylation *Nat Struct Biol* (Vol. 7, pp. 838-842).

- Sheetz M.P. & Singer, S.J. (1974). Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions *Proc Natl Acad Sci USA* (Vol. 71, pp. 4457-4461).
- Sherr C.J. (2004). Principles of tumor suppression *Cell* (Vol. 116, pp. 235-246).
- Shivaswamy S. & Bhargava, P. (2006). Positioned nucleosomes due to sequential remodeling of the yeast U6 small nuclear RNA chromatin are essential for its transcriptional activation *J Biol Chem* (Vol. 281, pp. 10461-10472).
- Shivaswamy S., Kassavetis, G.A. & Bhargava, P. (2004). High-level activation of transcription of the yeast U6 snRNA gene in chromatin by the basal RNA polymerase III transcription factor TFIIC *Mol Cell Biol* (Vol. 24, pp. 3596-3606).
- Simmen K.A., Bernues, J., Lewis, J.D. & Mattaj, I.W. (1992). Cofractionation of the TATA-binding protein with the RNA polymerase III transcription factor TFIIB. *Nucleic Acids Res*, 20(22), 5889-5898
- Slattery M.G., Liko, D. & Heideman, W. (2008). Protein kinase A, TOR, and glucose transport control the response to nutrient repletion in *Saccharomyces cerevisiae* *Eukaryotic Cell* (Vol. 7, pp. 358-367).
- Soragni E. & Kassavetis, G.A. (2008). Absolute gene occupancies by RNA polymerase III, TFIIB, and TFIIC in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 283(39), 26568-26576
- Soutourina J., Bordas-Le Floch, V., Gendrel, G., Flores, A., Ducrot, C., Dumay-Odelot, H., Soularue, P., Navarro, F., Cairns, B., Lefebvre, O. & Werner, M. (2006). Rsc4 connects the chromatin remodeler RSC to RNA polymerases *Mol Cell Biol* (Vol. 26, pp. 4920-4933).
- Spellman P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D. & Futcher, B. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization *Mol. Biol. Cell* (Vol. 9, pp. 3273-3297).
- Stan R., McLaughlin, M.M., Cafferkey, R., Johnson, R.K., Rosenberg, M. & Livi, G.P. (1994). Interaction between FKBP12-rapamycin and TOR involves a conserved serine residue. *J Biol Chem*, 269(51), 32027-32030
- Stark C., Breitkreutz, B.J., Chatr-Aryamontri, A., Boucher, L., Oughtred, R., Livstone, M.S., Nixon, J., Van Auken, K., Wang, X., Shi, X., Reguly, T., Rust, J.M., Winter, A., Dolinski, K. & Tyers, M. (2011). The BioGRID Interaction Database: 2011 update *Nucleic Acids Research* (Vol. 39, pp. D698-704).
- Stefanovsky V.Y., Pelletier, G., Hannan, R., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L.I. & Moss, T. (2001). An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF *Mol Cell* (Vol. 8, pp. 1063-1073).
- Steffan J.S., Keys, D.A., Dodd, J.A. & Nomura, M. (1996). The role of TBP in rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*: TBP is required for upstream activation factor-dependent recruitment of core factor. *Genes Dev*, 10(20), 2551-2563
- Stein T., Crighton, D., Boyle, J.M., Varley, J.M. & White, R.J. (2002). RNA polymerase III transcription can be derepressed by oncogenes or mutations that compromise p53 function in tumours and Li-Fraumeni syndrome *Oncogene* (Vol. 21, pp. 2961-2970).
- Strahl B.D. & Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications *Nature* (Vol. 403, pp. 41-45).
- Stuart D. (2008). The meiotic differentiation program uncouples S-phase from cell size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle*, 7(6), 777-786

- Sutcliffe J.E., Brown, T.R., Allison, S.J., Scott, P.H. & White, R.J. (2000). Retinoblastoma protein disrupts interactions required for RNA polymerase III transcription *Mol Cell Biol* (Vol. 20, pp. 9192-9202).
- Taylor J.H. (1960). Nucleic acid synthesis in relation to the cell division cycle *Ann N Y Acad Sci* (Vol. 90, pp. 409-421).
- Teichmann M., Dieci, G., Huet, J., Ruth, J., Sentenac, A. & Seifart, K.H. (1997). Functional interchangeability of TFIIIB components from yeast and human cells in vitro. *EMBO J*, 16(15), 4708-4716.
- Teichmann M., Dieci, G., Pascali, C. & Boldina, G. (2010). General transcription factors and subunits of RNA polymerase III: Paralogs for promoter- and cell type-specific transcription in multicellular eukaryotes. *Transcr*, 1(3), 130-135
- Teichmann M. & Seifart, K.H. (1995). Physical separation of two different forms of human TFIIIB active in the transcription of the U6 or the VAI gene in vitro. *EMBO J*, 14(23), 5974-5983
- Terasima T. & Tolmach, L.J. (1963). Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells *Exp Cell Res* (Vol. 30, pp. 344-362).
- Thevelein J.M. (1994). Signal transduction in yeast. *Yeast*, 10(13), 1753-1790
- Thevelein J.M. & de Winde, J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Microbiol* (Vol. 33, pp. 904-918).
- Thomas M.C. & Chiang, C.M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 41(3), 105-178
- Thompson D.M., Lu, C., Green, P.J. & Parker, R. (2008). tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes *RNA* (Vol. 14, pp. 2095-2103).
- Thompson D.M. & Parker, R. (2009). Stressing out over tRNA cleavage *Cell* (Vol. 138, pp. 215-219).
- Thompson M., Haeusler, R.A., Good, P.D. & Engelke, D.R. (2003). Nucleolar clustering of dispersed tRNA genes *Science* (Vol. 302, pp. 1399-1401).
- Thuillier V., Stettler, S., Sentenac, A., Thuriaux, P. & Werner, M. (1995). A mutation in the C31 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III affects transcription initiation. *EMBO J*, 14(2), 351-359
- Todaka Y., Wang, Y., Tashiro, K., Nakashima, N., Nishimoto, T. & Sekiguchi, T. (2005). Association of the GTP-binding protein Gtr1p with Rpc19p, a shared subunit of RNA polymerase I and III in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 170(4), 1515-1524
- Tower J. & Sollner-Webb, B. (1988). Polymerase III transcription factor B activity is reduced in extracts of growth-restricted cells *Mol Cell Biol* (Vol. 8, pp. 1001-1005).
- Towpik J., Graczyk, D., Gajda, A., Lefebvre, O. & Boguta, M. (2008). Derepression of RNA polymerase III transcription by phosphorylation and nuclear export of its negative regulator, Maf1 *J Biol Chem* (Vol. 283, pp. 17168-17174).
- Trumtel S., Léger-Silvestre, I., Gleizes, P.E., Teulières, F. & Gas, N. (2000). Assembly and functional organization of the nucleolus: ultrastructural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants *Mol Biol Cell* (Vol. 11, pp. 2175-2189).
- Upadhy R., Lee, J. & Willis, I.M. (2002). Maf1 is an essential mediator of diverse signals that repress RNA polymerase III transcription *Mol Cell* (Vol. 10, pp. 1489-1494).
- Urban J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., Broach, J.R., De Virgilio, C., Hall, M.N. & Loewith, R. (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell* (Vol. 26, pp. 663-674).

- Van Dyke M.W. & Roeder, R.G. (1987). Multiple proteins bind to VA RNA genes of adenovirus type 2. *Mol Cell Biol*, 7(3), 1021-1031
- van Zyl W., Huang, W., Sneddon, A.A., Stark, M., Camier, S., Werner, M., Marck, C., Sentenac, A. & Broach, J.R. (1992). Inactivation of the protein phosphatase 2A regulatory subunit A results in morphological and transcriptional defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* (Vol. 12, pp. 4946-4959).
- Vannini A., Ringel, R., Kusser, A.G., Berninghausen, O., Kassavetis, G.A. & Cramer, P. (2010). Molecular basis of RNA polymerase III transcription repression by Maf1. *Cell* (Vol. 143, pp. 59-70).
- Vannini A., Ringel, R., Kusser, A.G., Berninghausen, O., Kassavetis, G.A. & Cramer, P. (2010). Molecular basis of RNA polymerase III transcription repression by Maf1. *Cell*, 143(1), 59-70
- Venters B.J., Irvin, J.D., Gramlich, P. & Pugh, B.F. (2011). Genome-wide transcriptional dependence on conserved regions of Mot1. *Mol Cell Biol* (Vol. 31, pp. 2253-2261).
- Veras I., Rosen, E.M. & Schramm, L. (2009). Inhibition of RNA polymerase III transcription by BRCA1. *J Mol Biol* (Vol. 387, pp. 523-531).
- Vežina C., Kudelski, A. & Sehgal, S.N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*, 28(10), 721-726
- Waldron C. & Lacroute, F. (1975). Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. *J Bacteriol* (Vol. 122, pp. 855-865).
- Waldschmidt R. & Seifart, K.H. (1992). TFIIA is required for in vitro transcription of mammalian U6 genes by RNA polymerase III. *J Biol Chem*, 267(23), 16359-16364
- Wang H.D., Trivedi, A. & Johnson, D.L. (1997). Hepatitis B virus X protein induces RNA polymerase III-dependent gene transcription and increases cellular TATA-binding protein by activating the Ras signaling pathway. *Mol Cell Biol* (Vol. 17, pp. 6838-6846).
- Wang H.D., Yuh, C.H., Dang, C.V. & Johnson, D.L. (1995). The hepatitis B virus X protein increases the cellular level of TATA-binding protein, which mediates transactivation of RNA polymerase III genes. *Mol Cell Biol* (Vol. 15, pp. 6720-6728).
- Wang J.Y., Sarker, A.H., Cooper, P.K. & Volkert, M.R. (2004). The single-strand DNA binding activity of human PC4 prevents mutagenesis and killing by oxidative DNA damage. *Mol Cell Biol* (Vol. 24, pp. 6084-6093).
- Wang L., Haeusler, R.A., Good, P.D., Thompson, M., Nagar, S. & Engelke, D.R. (2005). Silencing near tRNA genes requires nucleolar localization. *J Biol Chem*, 280(10), 8637-8639
- Wang Y., Nakashima, N., Sekiguchi, T. & Nishimoto, T. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* GTPase complex: Gtr1p-Gtr2p regulates cell-proliferation through *Saccharomyces cerevisiae* Ran-binding protein, Yrb2p. *Biochem Biophys Res Commun*, 336(2), 639-645
- Wang Y., Pierce, M., Schnepfer, L., Güldal, C.G., Zhang, X., Tavazoie, S. & Broach, J.R. (2004). Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast. *PLoS Biol* (Vol. 2, pp. E128).
- Wang Z., Bai, L., Hsieh, Y.J. & Roeder, R.G. (2000). Nuclear factor 1 (NF1) affects accurate termination and multiple-round transcription by human RNA polymerase III. *EMBO J*, 19(24), 6823-6832
- Wang Z., Luo, T. & Roeder, R.G. (1997). Identification of an autonomously initiating RNA polymerase III holoenzyme containing a novel factor that is selectively inactivated during protein synthesis inhibition. *Genes Dev*, 11(18), 2371-2382
- Wang Z. & Roeder, R.G. (1995). Structure and function of a human transcription factor TFIIB subunit

- that is evolutionarily conserved and contains both TFIIB- and high-mobility-group protein 2-related domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(15), 7026-7030
- Wang Z.& Roeder, R.G. (1996). TFIIC1 acts through a downstream region to stabilize TFIIC2 binding to RNA polymerase III promoters. *Mol Cell Biol*, 16(12), 6841-6850
- Wang Z.& Roeder, R.G. (1997). Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. *Genes Dev*, 11(10), 1315-1326
- Wang Z.& Roeder, R.G. (1998). DNA topoisomerase I and PC4 can interact with human TFIIC to promote both accurate termination and transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Mol Cell*, 1(5), 749-757
- Wanke V., Cameroni, E., Uotila, A., Piccolis, M., Urban, J., Loewith, R.& De Virgilio, C. (2008). Caffeine extends yeast lifespan by targeting TORC1 *Mol Microbiol* (Vol. 69, pp. 277-285).
- Warner J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast *Trends Biochem Sci* (Vol. 24, pp. 437-440).
- Weber J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J.& Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53 *Nat Cell Biol* (Vol. 1, pp. 20-26).
- Wei Y., Tsang, C.K.& Zheng, X.F. (2009). Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1 *EMBO J* (pp. 10.1038/emboj.2009.1179).
- Wei Y.& Zheng, X.F. (2009). Sch9 partially mediates TORC1 signaling to control ribosomal RNA synthesis. *Cell Cycle*, 8(24), 4085-4090
- Wei Y.& Zheng, X.S. (2010). Maf1 regulation: A model of signal transduction inside the nucleus *Nucleus (Austin, Tex)* (Vol. 1, pp. 162-165).
- Werner M., Chaussivert, N., Willis, I.M.& Sentenac, A. (1993). Interaction between a complex of RNA polymerase III subunits and the 70-kDa component of transcription factor IIIB. *J Biol Chem*, 268(28), 20721-20724
- Werner M., Hermann-Le Denmat, S., Treich, I., Sentenac, A.& Thuriaux, P. (1992). Effect of mutations in a zinc-binding domain of yeast RNA polymerase C (III) on enzyme function and subunit association. *Mol Cell Biol*, 12(3), 1087-1095
- Werten S., Langen, F.W., van Schaik, R., Timmers, H.T., Meisterernst, M.& van der Vliet, P.C. (1998). High-affinity DNA binding by the C-terminal domain of the transcriptional coactivator PC4 requires simultaneous interaction with two opposing unpaired strands and results in helix destabilization *J Mol Biol* (Vol. 276, pp. 367-377).
- Werten S.& Moras, D. (2006). A global transcription cofactor bound to juxtaposed strands of unwound DNA *Nat Struct Mol Biol* (Vol. 13, pp. 181-182).
- Werten S., Stelzer, G., Goppelt, A., Langen, F.M., Gros, P., Timmers, H.T., van der Vliet, P.C.& Meisterernst, M. (1998). Interaction of PC4 with melted DNA inhibits transcription *EMBO J* (Vol. 17, pp. 5103-5111).
- Weser S., Bachmann, M., Seifart, K.H.& Meissner, W. (2000). Transcription efficiency of human polymerase III genes in vitro does not depend on the RNP-forming autoantigen La. *Nucleic Acids Res*, 28(20), 3935-3942
- White R.J. (2004). RNA polymerase III transcription and cancer *Oncogene* (Vol. 23, pp. 3208-3216).
- White R.J. (2008). RNA polymerases I and III, non-coding RNAs and cancer *Trends Genet* (Vol. 24, pp. 622-629).
- White R.J. (2011). Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nat Rev Genet*, 12(7), 459-463

- White R.J., Gottlieb, T.M., Downes, C.S.& Jackson, S.P. (1995). Cell cycle regulation of RNA polymerase III transcription *Mol Cell Biol* (Vol. 15, pp. 6653-6662).
- White R.J., Gottlieb, T.M., Downes, C.S.& Jackson, S.P. (1995). Mitotic regulation of a TATA-binding-protein-containing complex *Mol Cell Biol* (Vol. 15, pp. 1983-1992).
- White R.J., Khoo, B.C., Inostroza, J.A., Reinberg, D.& Jackson, S.P. (1994). Differential regulation of RNA polymerases I, II, and III by the TBP-binding repressor Dr1. *Science*, 266(5184), 448-450
- White R.J., Stott, D.& Rigby, P.W. (1989). Regulation of RNA polymerase III transcription in response to F9 embryonal carcinoma stem cell differentiation *Cell* (Vol. 59, pp. 1081-1092).
- Whitehall S.K., Bardeleben, C.& Kassavetis, G.A. (1994). Hydrolytic cleavage of nascent RNA in RNA polymerase III ternary transcription complexes. *J Biol Chem*, 269(3), 2299-2306
- Whitmarsh A.J.& Davis, R.J. (2000). A central control for cell growth *Nature* (Vol. 403, pp. 255-256).
- Willis I.M., Desai, N.& Upadhyya, R. (2004). Signaling repression of transcription by RNA polymerase III in yeast *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* (Vol. 77, pp. 323-353).
- Willis I.M.& Moir, R.D. (2007). Integration of nutritional and stress signaling pathways by Maf1 *Trends Biochem Sci* (Vol. 32, pp. 51-53).
- Willis I.M.& Moir, R.D. (2007). Integration of nutritional and stress signaling pathways by Maf1. *Trends Biochem Sci*, 32(2), 51-53
- Woiwode A., Johnson, S.A., Zhong, S., Zhang, C., Roeder, R.G., Teichmann, M.& Johnson, D.L. (2008). PTEN represses RNA polymerase III-dependent transcription by targeting the TFIIIB complex *Mol Cell Biol* (Vol. 28, pp. 4204-4214).
- Wolin S.L.& Cedervall, T. (2002). The La protein. *Annu Rev Biochem*, 71, 375-403
- Wu W.H., Pinto, I., Chen, B.S.& Hampsey, M. (1999). Mutational analysis of yeast TFIIIB. A functional relationship between Ssu72 and Sub1/Tsp1 defined by allele-specific interactions with TFIIIB *Genetics* (Vol. 153, pp. 643-652).
- Wullschleger S., Loewith, R.& Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism *Cell* (Vol. 124, pp. 471-484).
- Wyatt M.D.& Pittman, D.L. (2006). Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks *Chem Res Toxicol* (Vol. 19, pp. 1580-1594).
- Xue Y., Batlle, M.& Hirsch, J.P. (1998). GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Galpha subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J*, 17(7), 1996-2007
- Yee N.S., Gong, W., Huang, Y., Lorent, K., Dolan, A.C., Maraia, R.J.& Pack, M. (2007). Mutation of RNA Pol III subunit *rpc2/polr3b* Leads to Deficiency of Subunit *Rpc11* and disrupts zebrafish digestive development *PLoS Biol* (Vol. 5, pp. e312).
- Yen T.S. (1996). Hepadnaviral X Protein:Review of Recent Progress. *J Biomed Sci*, 3(1), 20-30
- Yoo C.J.& Wolin, S.L. (1997). The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell*, 89(3), 393-402
- Yuan C.C., Zhao, X., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P.& Hernandez, N. (2007). CHD8 associates with human Staf and contributes to efficient U6 RNA polymerase III transcription. *Mol Cell Biol*, 27(24), 8729-8738
- Zaman S., Lippman, S.I., Schneper, L., Slonim, N.& Broach, J.R. (2009). Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways *Mol Syst Biol* (Vol. 5, pp. 245).
- Zaman S., Lippman, S.I., Zhao, X.& Broach, J.R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients

*Annu Rev Genet* (Vol. 42, pp. 27-81).

- Zaragoza D., Ghavidel, A., Heitman, J.& Schultz, M.C. (1998). Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway *Mol Cell Biol* (Vol. 18, pp. 4463-4470).
- Zhang Q., Zhong, Q., Evans, A.G., Levy, D.& Zhong, S. (2011). Phosphorylation of histone H3 serine 28 modulates RNA polymerase III-dependent transcription *Oncogene* (pp. 10.1038/onc.2011.1105).
- Zhong S., Fromm, J.& Johnson, D.L. (2007). TBP is differentially regulated by c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) and JNK2 through Elk-1, controlling c-Jun expression and cell proliferation. *Mol Cell Biol*, 27(1), 54-64
- Zhong S.& Johnson, D.L. (2009). The JNKs differentially regulate RNA polymerase III transcription by coordinately modulating the expression of all TFIIIB subunits *Proc Natl Acad Sci USA* (Vol. 106, pp. 12682-12687).



## **Caractérisation de la régulation de la transcription par l'ARN polymérase III chez *Saccharomyces cerevisiae***

### **Résumé**

L'ARN polymérase III synthétise de nombreux petits ARN non traduits, dont les ARNt et l'ARNr 5S, essentiels à la croissance de toute cellule. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la régulation de la transcription par l'ARN polymérase III chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons détecté Sub1 sur les gènes de classe III *in vivo*. Nous avons également observé que Sub1 est capable de stimuler la transcription par l'ARN III reconstituée *in vitro* avec les facteurs TFIIIB et TFIIIC recombinants et avec l'ARN Pol III purifiée. Sub1 stimule deux étapes de la transcription : l'initiation et la réinitiation facilitée. Des expériences supplémentaires nous montrent que la protéine interagit directement avec TFIIIB et TFIIIC. Enfin, nous avons pu constater que la délétion de Sub1 dans la levure conduit à une diminution de la transcription par l'ARN Pol III en phase exponentielle de croissance. Par la suite, nous avons cherché à déterminer quel lien pouvait exister entre l'activateur Sub1 et le répresseur Maf1 de la transcription par l'ARN Pol III. Enfin, nous avons également souhaité identifier d'autres éléments pouvant interagir avec la protéine Sub1 au cours de sa fonction de régulateur.

**Mots-clefs** : Sub1, ARN polymérase III, Maf1, Régulation de la transcription

---

## **Characterization of RNA polymerase III transcription regulation in *Saccharomyces cerevisiae***

### **Abstract**

RNA polymerase III synthesizes many small untranslated RNA, including tRNA and 5S rRNA which are essential to cell growth. In this work, we took an interest in RNA polymerase III transcription regulation in the baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. We have detected Sub1 on all class III genes *in vivo*. We also observed that Sub1 is able to stimulate RNA polymerase III transcription which has been reconstituted *in vitro* with TFIIIB et TFIIIC recombinants factors and purified RNA polymerase III. Sub1 stimulates two steps of RNA polymerase III transcription : initiation and facilitated reinitiation. Supplementary experiments established that Sub1 directly interacts with TFIIIB and TFIIIC transcription factors. Finally, we showed that Sub1 deletion in yeast leads to a decrease in RNA polymerase III transcription during exponential phase. Then, we tried to determine which link could exist between Sub1, the activator, and Maf1, the repressor of RNA polymerase III transcription. Furthermore, we attempted to identify other elements which could interact with Sub1 during transcription regulation.

**Keywords** : Sub1, RNA polymerase III, Maf1, transcription regulation