



HAL
open science

Régulation épigénétique de la machinerie de transcription de l'ARN polymérase III par l'histone désacétylase SIRT1

Julien Oury

► **To cite this version:**

Julien Oury. Régulation épigénétique de la machinerie de transcription de l'ARN polymérase III par l'histone désacétylase SIRT1. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ099 . tel-00923163

HAL Id: tel-00923163

<https://theses.hal.science/tel-00923163>

Submitted on 2 Jan 2014

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
(IGBMC - CNRS UMR 7104 - Inserm U964)

THÈSE présentée par :

Julien OURY

soutenue le : **28 Septembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Sciences du vivant / Aspects moléculaires de la
Biologie

**Régulation épigénétique de la machinerie de
transcription de l'ARN Polymérase III par
l'Histone Déacétylase SIRT1**

THÈSE dirigée par :

Dr. HAMICHE Ali

Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. TEICHMANN Martin

Université de Bordeaux

Dr. THIRIET Christophe

Université de Nantes

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. DAVIDSON Irwin

Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements, et ma gratitude, au Pr. Martin TEICHMANN, au Dr. Christophe THIRIET, et au Dr. Irwin DAVIDSON d'avoir accepté de juger ce travail, et de participer à la dernière étape de mes études.

Je remercie le Dr. Ali Hamiche de m'avoir accueilli au sein de son équipe et d'avoir su m'enseigner la rigueur et la minutie qui m'ont appris à mieux comprendre la démarche scientifique. Merci de m'avoir guidé et transmis votre passion pour la recherche. Travailler à vos côtés a été une grande chance pour moi. Je n'oublierai jamais le grand coup de pouce que vous m'avez donné en croyant en moi, avant même d'intégrer votre équipe. Lors de mon master, vous n'aviez aucune raison de m'aider dans la réalisation de mon rapport de stage, et dans la préparation de ma soutenance, et pourtant, vous avez tout fait pour que cette étape soit une réussite.

Je remercie le Dr. Christian Bronner pour son investissement et son aide si précieuse pour la fin de mon doctorat. Merci d'avoir participé à l'écriture de mon papier, et bien entendu aux différentes relectures de mon manuscrit.

Je tiens à exprimer ma gratitude au comité de la Ligue contre le Cancer pour avoir cru à mon projet et en me soutenant financièrement dans cette dernière année de thèse.

Merci à tous les membres du laboratoire présents et passés :

Tout d'abord, un merci général pour l'ambiance familiale au labo, pour les nombreuses discussions que nous avons eues, pour avoir supporté ma musique de "sauvage", pour avoir supporté mon caractère ronchon et mon côté bordélique et tête en l'air. Toutefois, je tiens à clamer haut et fort que le module 2071 est quand même le plus cool (désolé!).

Merci Arnaud, mon compagnon de fac, que j'ai appris à connaître réellement lors de ces quatre années de thèse. Tu m'as été d'une aide précieuse dans les bons comme dans les mauvais moments. Nous avons eu ensemble de nombreuses péripéties et je tiens aujourd'hui à te dire que tu es devenu un ami cher à mon coeur.

Merci Christophe, l'artiste. Tu m'as donné de nombreux conseils pour ta disponibilité et ton aide dans mes manip. Grâce à toi, les tests d'interactions sont devenus une formalité.

Sur vous deux, j'ai beaucoup d'anecdotes de soirées qui me viennent à l'esprit, mais comment dire... Ce n'est pas bon de tout révéler. Je me suis bien éclaté à vos côtés.

Merci Guillaume, mon compagnon récurrent de pauses clopes. Merci pour ta gentillesse et tes nombreuses tentatives pour m'expliquer les subtilités de l'informatique (c'est pas gagné!)

Merci Dr. Khalid, le roi de la colonne. Ta joie, ta bonne humeur, et ton côté taquin nous ont apporté une bonne dose de fraîcheur dans le module 2071.

Merci Mister Depaux. Ton débit de parole, ta non-connaissance du foot, et ton mépris pour le PSG n'ont pas toujours été faciles à supporter... Mais je tiens à te remercier pour ta bonne humeur de tous les jours, l'ambiance que tu mettais au labo, et puis aussi pour ton aide précieuse dans tous mes clonages.

Merci aux Ramain, Philippe et Catherine. Grâce à vous, je n'oublie pas que j'ai découvert, il y a maintenant bientôt dix ans, ce que c'est de travailler dans un laboratoire. Vous êtes un peu les responsables de mon envie d'évoluer dans ce milieu. Mention spéciale pour Philippe, le "papy", le "ieuv", l' "ancêtre", le "chauve", que ça ne te plaise ou non, le PSG sera champion!!!

Enfin un grand merci aux autres membres du labo, Muhammad, Vivek, Isabelle, Abdul, Maylis, Dorothée, et mes compagnons de galère et de clopes de l'institut.

Une mention toute spéciale pour Thomas, le "Rouques". Tu as été une grande découverte pour moi durant ces années. Tu fais à présent parti de la famille de la Vallée! Reste comme tu es, tu es une perle rare (un peu trop accroc aux apéros toutefois!).

Merci à mes amis de toujours, mes compagnons de route qui me suivent depuis toutes ces années. Vous n'allez pas aimé que je ne fasse pas un message personnel pour chacun d'entre vous, mais ça serait beaucoup, beaucoup trop long!! Je vous AIME tellement, je ne l'exprime peut être pas toujours de la bonne façon, mais vous êtes les personnes les plus importantes de ma vie, et j'espère ne jamais vous perdre!! (Hein, on se verra encore?!!!). Une petite dédicace à Virginie qui a eu la gentillesse de relire ce manuscrit et d'en corriger les fautes d'orthographe.

Merci à l'AS Natzwiller de m'avoir payé une bonne partie de mes études. Merci les gars de vous être blessés régulièrement, et d'avoir donné du travail à mon Papa. J'ai passé des années formidables avec vous, j'ai appris les valeurs d'une équipe et de solidarité, à défaut d'apprendre à jouer au foot.

Je remercie de tout mon coeur mes parents, mon frangin Franck, et ma belle-frangine Marine d'avoir toujours été à mes côtés. Je ne suis pas très doué pour exprimer mes sentiments, alors je profite de ce moment pour vous dire à quel point j'ai de la chance d'avoir une famille comme vous, vous êtes géniaux. Papa, Maman, je vous aime, oh que oui, je vous aime, vous êtes les meilleurs parents du monde!!

Enfin, je voudrais remercier Séverine. Nous avons tout traversé depuis les 5 ans que nous nous connaissons... Nous avons eu des hauts et des bas, mais tu m'as toujours apporté un soutien sans faille. Tu es la personne la plus importante de ma vie. Alors merci Séverine pour tout ce que tu m'apportes, pour ta confiance, ta joie de vivre, ton amour. A nous, l'aventure!!!! Je t'aime...

SOMMAIRE

1. Avant-Propos	7
2. Introduction	10
2.1. Architecture nucléaire	16
2.1.1. Structure de la chromatine	16
2.1.1.1. Historique	16
2.1.1.2. Condensation de l'ADN	18
2.1.1.2.1. Le collier de perle	18
2.1.1.2.2. La super hélice	19
2.1.1.2.3. Niveau supérieur de compaction	19
2.1.2. Structure de la chromatine	20
2.1.2.1. Organisation structurale de la chromatine	20
2.1.2.1.1. Structure du nucléosome, unité de base de la chromatine	21
2.1.2.1.2. Assemblage de la chromatine	23
2.1.2.2. Chromatine et transcription	26
2.2. La machinerie de transcription eucaryote	30
2.2.1. Généralités sur les ARN polymérase	30
2.2.2. Transcription initiée par l'ARN polymérase III	32
2.2.2.1. Les gènes de classe III	32
2.2.2.2. L'ARN polymérase III	35
2.2.2.2.1. Caractérisation biochimique	35
2.2.2.2.2. Les facteurs de transcription utilisés par l'ARN polymérase III	39
2.2.2.3. Formation des complexes de transcription	42
2.2.2.3.1. Structure des promoteurs des gènes de classe III	42
2.2.2.3.2. Assemblage des complexes de transcription	47
2.2.2.4. La machinerie de transcription de l'ARN Polymérase III	47
2.2.2.4.1. Initiation	47
2.2.2.4.2. Elongation	49
2.2.2.4.3. Terminaison	50
2.2.2.4.4. Réinitiation	51
2.2.3. Régulation de l'activité de la machinerie de transcription de l'ARN Polymérase III	51
2.3. Nucléosome et transcription	56
2.3.1. Modification des nucléosomes	56
2.3.2. Remodelage de la chromatine	57
2.3.2.1. La méthylation de l'ADN	57
2.3.2.2. Les ARNs non-codants	58
2.3.2.3. Les variantes d'histones	58
2.3.2.4. Les complexes ATP-dépendants remodelant la chromatine	61
2.3.2.5. Modifications post-traductionnelles des histones	64
2.4. La famille des Sirtuines	75
2.4.1. Les sirtuines chez la levure	75
2.4.2. Les sirtuines chez les mammifères	75
2.4.2.1. Fonctions des sirtuines chez les mammifères	76
2.4.2.2. Réactions enzymatiques effectuées par les sirtuines	80
2.4.3. SIRT1 ((Silent mating type information regulation 2 homolog) 1)	81
2.4.3.1. Organisation génomique	81

2.4.3.2. La protéine SIRT1	81
2.4.3.3. Régulation du niveau d'expression de SIRT1	82
2.4.3.4. Régulation de l'activité de SIRT1	83
2.4.4. Fonctions régulatrices de SIRT1	84
2.4.4.1. SIRT1 et Métabolisme	84
2.4.4.1.1. Le métabolisme du glucose	84
2.4.4.1.2. Le métabolisme lipidique	85
2.4.4.2. SIRT1 et Neuroprotection	87
2.4.4.3. SIRT1 et Cancer	88
2.4.4.4. SIRT1 et transcription	89
2.4.4.4.1. Régulation de la structure de la chromatine	89
2.4.4.4.2. Régulation de la transcription	90
2.4.4.4.3. Régulation des facteurs de transcription	93
3. But du projet.....	95
4. Résultats.....	98
5. Discussion et perspectives	128
6. Conclusion.....	140
7. Références.....	143

1. Avant-Propos

L'ADN est une macromolécule de taille conséquente, d'environ 2 mètres de long, pour 2,5 nanomètres de large, et tout le prodige d'une cellule réside dans sa capacité à maintenir une si grande quantité d'ADN au sein de l'espace si restreint d'un noyau cellulaire, dont le diamètre est de l'ordre du micromètre. Ainsi, le génome des cellules eucaryotes est organisé sous forme de chromatine, structure se composant de protéines histones liées à l'ADN. Initialement décrite comme ayant un rôle uniquement structural, la chromatine est en fait très dynamique jouant un rôle dans des processus comme la réplication, la régulation génique, la réparation et la ségrégation des chromosomes.

La chromatine comporte deux états fonctionnels, l'euchromatine, représentant un état relâché de la chromatine accessible à la machinerie de transcription, et l'hétérochromatine, ayant les caractéristiques d'une chromatine dense et compacte, plutôt réfractaire à la transcription de son contenu. Ces deux structures régulent ainsi le génome des cellules eucaryotes. Moins de 4% du génome humain est composé d'ADN contenant des gènes codant pour des protéines, alors que les 96% restants sont souvent qualifiés de "déchets génomiques" à cause de l'absence apparente d'utilité de cet ADN non codant et du caractère souvent répétitif de sa séquence en nucléotides. Cependant, l'amélioration de la compréhension des processus de régulation fournit une image plus complexe du rôle de ces séquences transcrites par la machinerie de transcription de l'ARN Polymérase III. En effet, ces nombreux ARN interviennent dans des voies métaboliques fondamentales de la cellule, notamment la traduction des ARN messagers et la maturation des ARN.

Les modifications épigénétiques incluant la méthylation de l'ADN, l'ajout ou l'enlèvement de groupements chimiques sur les histones, le remodelage ATP-dépendant de la chromatine et l'incorporation de variantes d'histones par des enzymes spécifiques sont des moyens dont disposent la cellule pour modifier l'accessibilité de l'ADN à des facteurs régulateurs et sont corrélées avec le statut transcriptionnel d'un gène.

L'acétylation joue un rôle clé dans la transcription. En effet, la marque principale caractérisant l'état inactif de la chromatine est déterminé par une déacétylation de la lysine 14 de l'histone H3. De nombreux activateurs transcriptionnels possèdent une activité histone acétyltransférase et un grand nombre de répresseurs une fonction histone déacétylase. Une des familles d'histones déacétylases les plus connues, est la famille des sirtuines. SIRT1 est d'ailleurs largement étudié dans cette famille. Elle est impliquée, par son action sur plusieurs facteurs de transcription, dans de nombreux phénomènes biologiques, inflammation, survie cellulaire, prolifération cellulaire ou métabolisme cellulaire.

Lors de ma thèse, je me suis focalisé sur l'identification d'une nouvelle voie de

contrôle, impliquant SIRT1, dans la régulation de la machinerie de transcription de l'ARN Polymérase III. Nous avons utilisé une approche protéomique pour identifier les partenaires associés à SIRT1 dans le noyau de la cellule, et notre attention s'est portée sur le marqueur de prolifération cellulaire, Ki67, et sur la sous-unité TFIIC, nécessaire pour l'assemblage du complexe de pré-initiation de l'ARN Polymérase III, deux protéines n'ayant jamais été décrites comme étant des partenaires de SIRT1 dans la littérature. Nous avons tout d'abord défini que ces trois partenaires se trouvent au sein d'un même complexe multi-protéique, puis nous avons déterminé, *in vitro* et *ex vivo*, que la prolifération cellulaire et la machinerie de transcription de l'ARN Polymérase III sont sous le contrôle de SIRT1, mais aussi de Ki67.

Afin d'introduire les résultats obtenus lors de ma thèse, la première partie de ce mémoire consistera en une synthèse bibliographique de (1) la structure et de la fonction de la chromatine, (2) de la machinerie de transcription de l'ARN Polymérase III, (3) de l'influence du "code histone" sur le phénomène de transcription et (4) enfin de la présentation de l'histone déacétylase SIRT1. La deuxième partie comportera les résultats issus de mes travaux sur SIRT1.

Nous discuterons des résultats dans une dernière partie en soulignant ce qui a été accompli et ce qu'il reste à faire. Enfin, nous essaierons de dégager les perspectives à venir dans la continuité de nos résultats intégrés aux connaissances actuelles accessibles puis d'en discuter l'intérêt dans l'apport et l'élargissement d'information concernant les modifications épigénétiques tant dans le modèle normal que dans le modèle pathologique.

2. Introduction

Liste des figures

- Figure 1.** Représentation schématique de la double hélice d'ADN et d'un brin d'ARN, et les différents nucléotides les composant
- Figure 2.** Représentation schématique des différents niveaux de compaction de la chromatine
- Figure 3.** Structure cristallographique d'un nucléosome
- Figure 4.** La structure du nucléosome
- Figure 5.** Modèle d'assemblage et de désassemblage de la chromatine
- Figure 6.** Les territoires euchromatiques et hétérochromatiques
- Figure 7.** Le transcriptome PolIII
- Figure 8.** Structure primaire des séquences nucléiques des SINEs et des LINEs
- Figure 9.** Composition de l'ARN polymérase III
- Figure 10.** Les sous-unités du facteur de transcription TFIIC
- Figure 11.** Les différents promoteurs de l'ARN polymérase III et ses composants
- Figure 12.** Représentation schématique de quelques voies de signalisation régulatrices de la transcription initiée par l'ARN polymérase III
- Figure 13.** Modifications post-traductionnelles d'histones et régulation transcriptionnelle
- Figure 14.** La diversité des variants d'histones et leurs implications fonctionnelles
- Figure 15.** Les complexes ATP-dépendants remodeleurs de la chromatine et leurs implications fonctionnelles
- Figure 16.** Schéma des domaines structuraux des sirtuines chez les mammifères
- Figure 17.** Principales propriétés des sirtuines chez les mammifères
- Figure 18.** Les réactions catalysées par les sirtuines
- Figure 19.** Représentation schématique des dommages induits par les rétrotransposons
- Figure 20.** Distribution dans les cancers des différents SINEs et LINEs

Listes des abréviations

5meC: 5-methyl cytosine

A: Adénine

A β : Amyloides- β

AceCS1: Acetyl-CoA Synthetase 1

ADN: Acide Désoxyribonucléique

APP: Précurseur Amyloïde

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ARNmi: MicroARN

ARNnc: ARN non codant

ARNr: ARN ribosomal

ARNr5S: ARN ribosomique 5S

ARNsi: ARNs interférent

ARNsn: Petit ARN nucléaire

ARNsno: Petit ARN nucléolaire

ARNt: ARN de transfert

AROS: Active Regulator Of Sirt1

ASF1: Antisilencing Function 1

ATF: Activating Transcription Factor

ATP: Adénosine Triphosphate

bHLH: basic helix-loop-helix

BTB/POZ: Bric-à-brac, tramtac, broad complex/Pox virus zinc fingers

C: Cytosine

CAF-1: Chromatin Assembly Factor 1

CBP: CREB Binding Protein

CENP-A: Centromere Protein A

CHD8: Chromodomain-Helicase-DNA binding protein 8

CK2: Casein Kinase 2

CREB: Cyclic AMP Responsive Element Binding protein

CTIP: Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor (COUP-TF)-interacting protein

DBC1: Deleted in Breast Cancer 1

DNMT: ADN méthyltransférase
DSE: Elément de Séquence Distal
Ezh2: Enhancer of Zeste Orthologue 2
FACT: Facilitates Chromatin Transcription
FoxO: Forkhead box O
G: Guanine
GNAT: GCN5-related Acétyltransférase
HAT: Histone Acétyl Transférase
HDAC: Histone Déacétylase
HDL: High Density Lipoprotein
HES1: Hairy and Enhancer of Split-1
HEY2: Hairy/Enhancer-of-split related with YRPW motif protein 2
HFD: Histone Fold Domain
HIC: Hypermethylated In Cancer
HIV-1: Human Immunodeficiency Virus-1
HKMT: Lysine-specific Histone Methyltransferase
HMG: High Mobility Group
HMT: Histones Méthyltransférase
LXR: Liver X Receptor
MCM: MiniChromosome Maintenance
Mef: Mouse Embryonic Fibroblast
MEF-2: Myocyte Enhancer Factor-2
MOZ: Monocytic Leukemia Zinc finger protein
NAD: Nicotinamide Adenosine Dinucleoside
NAP1: Nucleosome Assembly Protein 1
NASP: Nuclear Autoantigenic Sperm Protein
NCoR: Nuclear corepressor receptor
NES: Signal d'export nucléaire
NF- κ B: Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NLS: Signal de localisation nucléaire
nm:Nanomètre
NuRD: Nucleosome Remodelling and Deacetylating
Oct1: Octamer 1
PARG: Poly-(ADP-ribose) Glycohydrolase

PARP: Poly-(ADP-ribose) Polymérase

PBP: Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein

PCAF: p300/CBP associated Factor

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

pb: Paire de bases

PGC-1 α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 α

PKA: cAMP-dependent Protein Kinase

PolI: ARN Polymérase I

PolII: ARN Polymérase II

PolIII: ARN Polymérase III

PolIV: ARN Polymérase IV

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma

Pré-ARNr: Précurseur de l'ARN ribosomique

PNRC: Prolin-Rich Receptor

PRC: Polycomb Repressive Complex

PSE: Elément de Séquence Proximal

PTP1B: Protein Tyrosine Phosphatase 1B

PTF: Proximal sequence element-binding Transcription Factor

Rb: Rétinoblastome

RbAp: Rb associated protein

RDP3: Reduced Potassium Dependency 3

RMRP: RNA component of Mitochondrial RNA Processing endoribonuclease

ROS: Reactive Oxygen Species

Sas: Something About Silencing

SAM: S-adenosyl methionine

SENP1: Sentrin-specific Protease 1

SINE: Short Interspersed Repeated DNA Element

Sir: Silent Information Regulator

SIRT: (Silent mating type information regulation 2 homolog)

SMC: Structural Maintenance of Chromosomes

SMRT: Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor

SNAPc: snRNA Activating Protein complex

SP1: Specificity Protein 1

SPH: Sph1 Postoctamer Homology

SRBEP-1c: Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c
SRC: Steroid Receptor Coactivator
SRP: Signal Recognition Particle
STAF1: Selenocysteine tRNA gene Transcription Activating Factor 1
SUMO: Small Ubiquitin-related Modifier
Su(z)12: Suppressor of Zeste 12
T: Thymine
TAFI68: TATA-box binding protein-Associated Factor I of 68kDa
TFIIIA: Transcription Factor III A
TFIIIB: Transcription Factor III B
TFIIIC: Transcription Factor III C
TBP: TATA Binding Protein
TIP60: Tat Interacting Protein, 60 kDa
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TRF: TBP-Related Factor
TSA: Trichostatine
TTF-I: Transcription Termination Factor I
UCP2: Uncoupling Protein 2
UMP: Uridine Monophosphate
VA: Viral Associated

2.1. Architecture nucléaire

2.1.1. Structure de la chromatine

2.1.1.1. Historique

La chromatine est le terme utilisé pour désigner l'association entre une séquence d'acide désoxyribonucléique (ADN), des protéines et acides ribonucléiques (ARNs) qui l'entourent et la structurent.

La chromatine, appelée ainsi par Walther Flemming en 1882, suite à la visualisation par microscopie d'une structure dense au sein du noyau, fait référence au terme grec « khroma » signifiant « coloré ». Il décrivit pour la première fois les étapes d'une mitose en observant la forme la plus compacte de la chromatine, les chromosomes (Kornberg and Thomas, 1974; Paweletz, 2001).

Cependant, la découverte de la chromatine peut être attribuée à Friedrich Miescher en 1869, lorsqu'il identifia la « nucléine » à partir de pus de patients, substance riche en phosphate et présente dans toutes les cellules. En 1889, Richard Altmann détermina que la nucléine possède les propriétés d'un acide et proposa donc le terme d'« acide nucléique ». Toutefois, c'est la composante protéique basique, également détectée au sein de la nucléine, ultérieurement nommée « histones », qui intéressa préférentiellement les scientifiques de l'époque. Au début du 20^{ème} siècle, on admettait le dogme d'une information héréditaire portée par les protéines. Cette théorie étayait l'idée d'une information portée par les protéines, composées d'une séquence établie parmi 20 unités de base (20 acides aminés), bien plus complexe en apparence que l'ADN avec ses 4 unités de base, à savoir les nucléotides Adénine (A), Thymines (T), Cytosine (C) et Guanine (G) (**Figure 1**).

La fonction de l'ADN resta inconnue ou tout du moins âprement débattue jusqu'au milieu du 20^{ème} siècle. Les travaux d'Alfred Hershey et Martha Chase sur le phage T2 puis l'établissement de la structure de l'ADN par Watson et Crick (**Figure 1**) a imposé définitivement l'ADN comme support de l'hérédité (Hershey and Chase, 1952; Watson and Crick, 1953; Paweletz, 2001). De nos jours, il est clairement admis que l'information génétique codée par l'ADN est à la fois responsable de la diversité du monde vivant mais également des similitudes entre espèces. La théorie de l'évolution établie par Darwin, basée sur les comparaisons des caractères phénotypiques plus ou moins similaires entre espèces,

peut être associée à l'évolution de l'information génétique codée par l'ADN. La phylogénie moléculaire permet ainsi de classer les organismes entre eux en fonction de la similarité de séquences particulières de leur ADN, nucléaire ou mitochondriale.

La génétique est, cependant, trop restreinte pour déterminer les diversités au sein d'une même espèce, voire d'un même organisme, à un temps donné, comme au cours de sa vie. Toutes les cellules présentes au sein d'un même individu sont à priori strictement composées d'une séquence identique d'ADN. Il faut donc ajouter à cela un second paramètre qui peut être assimilé à l'« épigénétique ». Ce terme de Conrad Waddington servait, jusqu'à récemment, à tous les phénomènes héréditaires inexpliqués par la seule génétique (Kornberg and Thomas, 1974). Selon Waddington, l'épigénétique était « la branche de la Biologie qui étudiait les interactions entre les gènes et leurs produits qui transforment le phénotype en un être ». Ainsi, il avait comme but de comprendre, comment les phénomènes environnementaux, comme la température ou les drogues, peuvent influencer sur le développement d'un organisme (Waddington, 1942). Actuellement, on définit l'épigénétique comme l'étude des changements héréditaires dans la régulation de l'information codée par les gènes, transmis d'une génération de cellules ou d'un organisme à la suivante, et qui ne proviennent pas de modifications au sein même de la séquence d'ADN nucléaire.

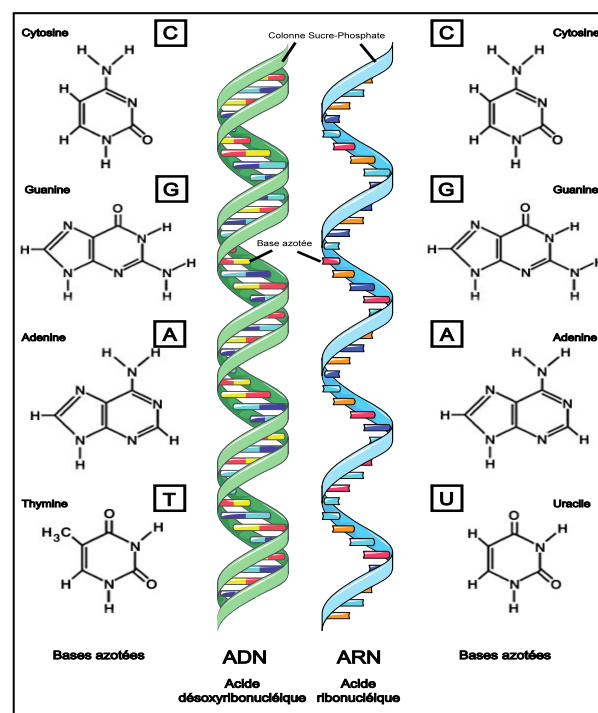


Figure 1. Représentation schématique de la double hélice d'ADN et d'un brin d'ARN, et les différents nucléotides les composant.

2.1.1.2. Condensation de l'ADN

L'ADN contenu dans un noyau d'une cellule humaine est composé d'environ 30000 gènes, répartis au sein de 23 paires de chromosomes pour un total de 6,4 milliards de bases. L'ADN est une macromolécule de taille conséquente, environ 2 mètres de long, pour 2 nanomètres (nm) de large (**Figure 2**). Tout le prodige d'une cellule réside dans sa capacité à maintenir une si grande quantité d'ADN au sein de l'espace si restreint d'un noyau cellulaire. La cellule doit structurer son ADN sans s'emmêler, tout en restant capable d'accéder à n'importe quel moment à l'information codée par un gène précis. Ceci permet l'accès en temps voulu à la machinerie cellulaire pour diverses activités telles que la réplication, la transcription, la réparation, etc... Ce phénomène de compaction est accompli par des protéines qui lient et replient l'ADN pour produire une série d'enroulements et de boucles conduisant à des niveaux d'organisations de plus en plus élevés. On appelle ce complexe nucléoprotéique contenu dans le noyau de nos cellules, la « chromatine » (**Figure 2**). Il existe différents niveaux de compactations que nous allons aborder maintenant:

2.1.1.2.1. Le collier de perle

Le premier niveau de compaction de la chromatine est la fibre de 11nm également appelée «collier de perles» (**Figure 2**). Cette fibre correspond à l'enroulement de l'ADN autour de protéines particulières appelées « histones cœur ». Les histones cœur sont des protéines hautement conservées au cours de l'évolution, et donc essentielles pour les organismes eucaryotes. Elles sont principalement synthétisées au cours de la phase S, dite de réplication, afin de permettre leur incorporation dans l'ADN néosynthétisé. Elles possèdent un domaine «histone fold», en commun, qui permet l'interaction dite «en poignée de main» entre histones, et l'interaction avec l'ADN. Les histones canoniques sont au nombre de quatre, l'histone H3, l'histone H4, l'histone H2A, et l'histone H2B. Elles s'assemblent en une particule très structurée autour de laquelle s'enroule l'ADN pour former l'unité de base de cette structure : le nucléosome. En 1997, les travaux de cristallographie aux rayons X du Pr. T. Richmond (Luger et al., 1997) (**Figure 3**) ont permis de déterminer la structure du nucléosome, à savoir un octamère d'histones autour duquel s'enroulent 146 paires de bases (pb) d'ADN. Les deux dimères H3/H4 s'associent pour former un tétramère central sur lequel viennent ensuite se fixer les deux dimères H2A/H2B (Luger et al., 1997). L'ADN

nucléosomal vient alors entourer l'octamère en liant les domaines « histones fold » (HFD) permettant une compaction de l'ADN d'un facteur supérieur à 5. On distingue ainsi l'ADN nucléosomal qui s'enroule autour des histones (146 pb) et l'ADN internucléosomal (ADN linker) qui relie deux nucléosomes (40 à 70 pb). Enfin, chaque nucléosome a la particularité d'exposer à l'extérieur de la particule des queues N-terminales non structurées. Ces derniers, faciles d'accès, constituent des cibles pour de nombreuses modifications par des enzymes spécifiques. Ce processus est largement utilisé par la cellule à des fins de régulation de la transcription. Malgré cette organisation, la fibre de 11nm n'est pas suffisante pour compacter l'ADN dans le noyau des cellules.

2.1.1.2.2. La super hélice

Le deuxième niveau de compaction de la chromatine est la fibre de 30nm également appelée «super hélice» ou «solénoïde». Il existe à l'heure actuelle deux différents modèles de repliement. La fibre de 11nm s'enroule sur elle même pour former une structure de 30nm de diamètre dont chaque tour comprend entre 6 et 8 nucléosomes (Coffin et al., 1997; Tremethick, 2007). Cette liaison entre nucléosomes est assurée par une cinquième histone, H1. L'histone H1, également appelée histone de liaison présente une caractéristique structurale supplémentaire par rapport aux histones cœurs. Bien que possédant un domaine globulaire central et une queue N-terminale, elle possède également une queue C-terminale non structurée permettant la liaison entre l'ADN internucléosomal et le nucléosome. Cette association constitue le chromatosome et facilite ainsi le repliement du collier de perle avec une stœchiométrie d'une histone H1 pour un nucléosome.

2.1.1.2.3. Niveau supérieur de compaction

Durant l'interphase, la chromatine est hautement organisée. On distingue l'euchromatine de l'hétérochromatine. L'euchromatine correspond à l'état peu condensé et transcriptionnellement actif de la chromatine alors que l'hétérochromatine correspond à l'état condensée et inactif de cette même chromatine.

Au moment de la mitose, la chromatine atteint son niveau maximal de compaction. Durant la métaphase, la super hélice d'ADN va subir diverses contraintes physiques pour former les chromosomes métaphasiques. Des protéines non histones comme la topoisomérase II ou les protéines SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) vont alors participer à

l'organisation de la structure en formant une « charpente protéique » sur laquelle vont venir se fixer des boucles de fibres de 30nm (Marsden and Laemmli, 1979; Deininger and Batzer, 2002).

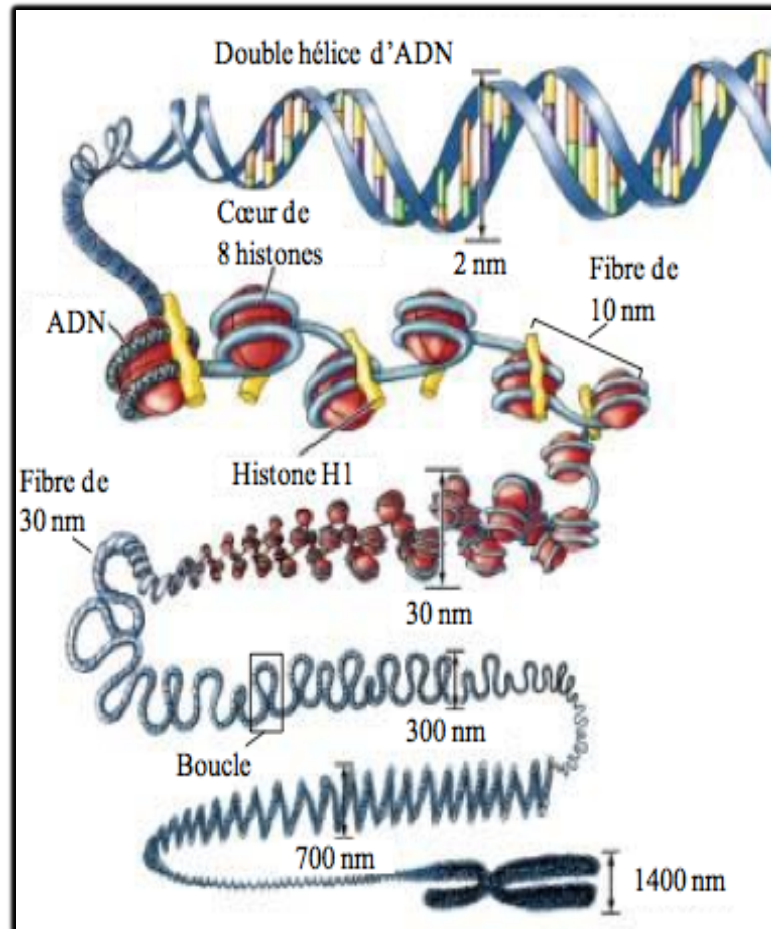


Figure 2. Représentation schématique des différents niveaux de compaction de la chromatine (issu de *Pearson Education*)

2.1.2. Structure de la chromatine

2.1.2.1. Organisation structurale de la chromatine

146 paires de bases d'ADN chromosomique s'enroulent autour d'un octamère d'histones, formant le nucléosome: l'unité de base de la chromatine (Kornberg and Thomas, 1974; Richmond and Davey, 2003) (**Figure 3**). Cette organisation est continuellement

remodelée pour réguler des fonctions cellulaires fondamentales comme la transcription, la réplication, et la réparation de l'ADN.

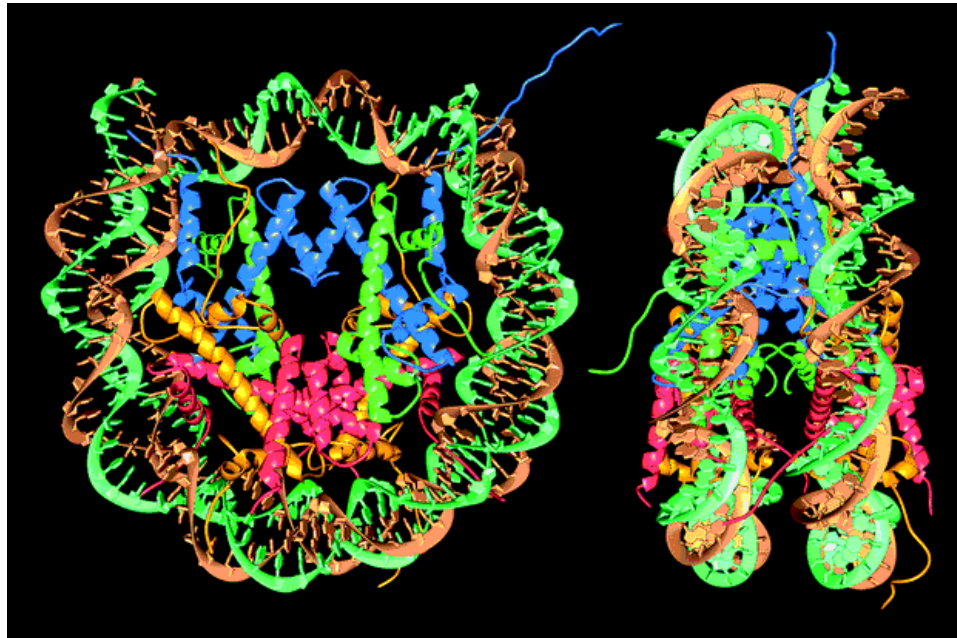


Figure 3. Structure cristallographique d'un nucléosome (image issue Luger et al., 1997).

2.1.2.1.1. Structure du nucléosome, unité de base de la chromatine

Les histones sont de petites protéines globulaires très basiques, riches en lysine et en arginine, pauvres en acides aminés aromatiques et dépourvues de tryptophane. Ces protéines sont parmi les protéines les plus conservées de l'évolution, elles sont présentes en très grande quantité (environ 60 millions de molécules de chaque type par cellule), et leur masse totale dans la chromatine est égale à environ celle de l'ADN lui-même. Il en existe 5 types principaux: H2A, H2B, H3, H4 (histones dites de «cœur») et H1 (histones de liaison). Les histones dites de « cœur » constituent le cœur du nucléosome, autour duquel est enroulé l'ADN (**Figure 4**). Les histones de liaisons, beaucoup plus variables, interagissent avec l'ADN de deux nucléosomes contigus. Ces protéines présentent une grande similitude en terme de séquence et de structure ce qui suggère une origine commune (Rowold and Herrera, 2000; Cleveland et al., 2003), et traduit le rôle structural vital des histones dans la formation de la chromatine, la mieux conservée étant l'histone H4. L'ordre de stabilité évolutive des histones (H3-H4 ; H2A-H2B ; H1) est corrélé avec leur localisation dans le nucléosome. Les

histones H3 et H4 forment le cœur interne du nucléosome tandis que la paire H2A-H2B est ajoutée latéralement, et que l'histone H1 est plus externe (**Figure 4**).

Les histones « cœur » sont organisées en deux domaines bien distincts : une queue N-terminale peu structurée fortement chargée positivement soumises aux modifications post-traductionnelles, et un domaine C-terminal globulaire qui adopte une structure particulière dite « histone fold » (HFD). Ce dernier permet aux histones d'interagir entre elles par des interactions de nature hydrophobe.

La structure du motif HFD, commun aux histones H2A, H2B, H3 et H4 (Arents et al., 1991; Batzer and Deininger, 2002) est constituée d'une longue hélice alpha flanquée de deux hélices plus courtes reliées par des boucles formées de feuillet beta. Ce repliement intervient dans les interactions entre histones au sein du nucléosome (Arents et al., 1991). Des études cristallographiques ont montré que le nucléosome est organisé en octamère, constitué d'un tétramère central (H3/H4)₂ flanqué par deux dimères H2A/H2B (Arents et al., 1991) (**Figure 4**). A force ionique physiologique, ces interactions sont plus fortes et spécifiques entre H3 et H4 pour former des tétramères en forme de « fer à cheval tordu », et entre H2A et H2B pour former des dimères en forme de « poignée de main ». A très forte force ionique, l'octamère d'histone peut se former comme une unité entière en absence d'ADN (Eickbush and Moudrianakis, 1978). Les cœurs nucléosomaux sont impliqués dans de nombreuses interactions avec le squelette de l'ADN. L'orientation des grands et petits sillons par rapport à la surface des nucléosomes est un point critique de l'accessibilité de l'ADN. En effet, le site de fixation d'une protéine peut être inaccessible s'il est tourné vers l'intérieur du nucléosome. Par exemple, la TATA Binding Protein (TBP) se fixe sur la boîte TATA dans le petit sillon de l'ADN. Si le petit sillon de la boîte TATA est orienté vers la surface du nucléosome, la capacité de TBP à se fixer sur la boîte TATA est diminuée (Imbalzano et al., 1994). Les nucléosomes et leurs positionnements sur la séquence régulent donc l'accessibilité de l'ADN aux protéines qui s'y fixent.

Les queues N-terminales des histones sont peu structurées et sortent du nucléosome. Elles sont soumises à un grand nombre de modifications post-traductionnelles covalentes : méthylation, acétylation, phosphorylation, ADP-ribosylation, ubiquitinylation... Ces modifications sont reconnues par de nombreuses protéines de régulation telles que celles interagissant avec les promoteurs des gènes pour « allumer ou éteindre » leur expression, et permettre ainsi des interactions avec les composants qui organisent la structure de la chromatine (Hecht et al., 1995; Xue et al., 2000). Les queues des histones H3 et H2B s'intercalent entre les boucles d'ADN et s'enroulent autour du nucléosome. Une partie de la

queue amino-terminale de l'histone H2A interagit avec l'ADN à l'extérieur de l'hélice au niveau du petit sillon. Par ailleurs, plusieurs résidus basiques des queues d'histones H4 interagissent avec une région très acide de l'hétérodimère H2A/H2B (**Figure 4**). Ils pourraient donc être impliqués dans les interactions entre nucléosomes adjacents et ainsi favoriser l'assemblage de structures d'ordre supérieur ou le repliement de la fibre de la chromatine.

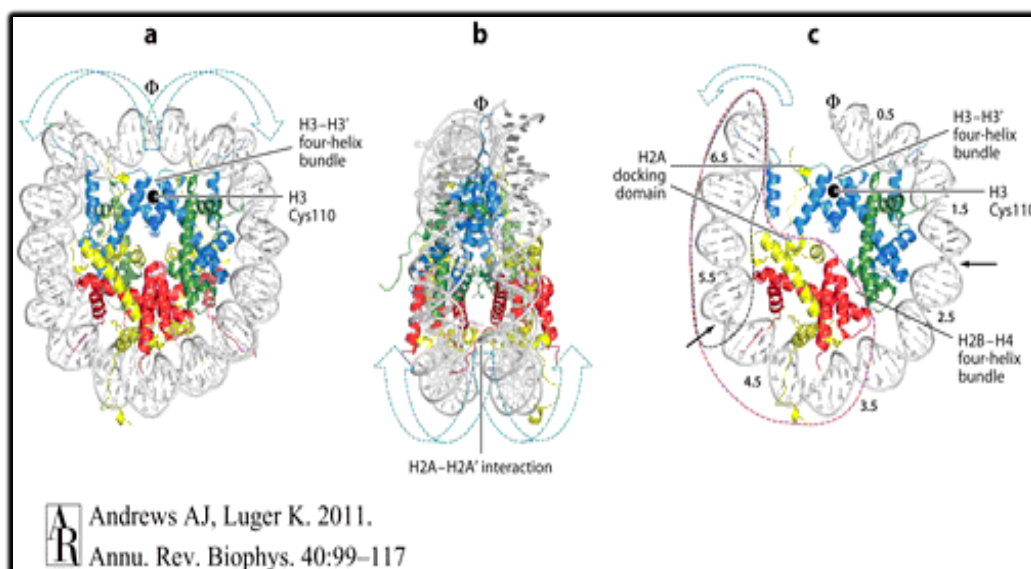


Figure 4. La structure du nucléosome (d'après Luger et al., 2011).

2.1.2.1.2. Assemblage de la chromatine

Les nucléosomes peuvent être assemblés, déplacés, et désassemblés par des complexes protéiques composés de chaperones d'histones et de facteurs de remodelage de la chromatine. Les histones non-nucléosomales sont essentiellement présentes en interaction avec les chaperons d'histones afin d'éviter la formation d'agrégats qui seraient toxiques pour la cellule. Ces chaperones d'histones jouent des rôles clés à tous les stades d'existence des histones. Après leur synthèse, les chaperones les lient, les escortent dans le noyau et les aident à s'associer et se dissocier spécifiquement de l'ADN selon le processus cellulaire (Haushalter and Kadonaga, 2003; Loyola and Almouzni, 2004).

Il existe deux types d'assemblage de la chromatine. Le premier mécanisme, que nous allons détailler ci-dessous, est dépendant de la réplication de l'ADN impliquant les histones canoniques H2A, H2B, H3, et H4. Le deuxième type d'assemblage de la chromatine est indépendant de la réplication, il se produit donc dans des conditions particulières, notamment

pendant la réparation, la recombinaison, la transcription de l'ADN (Schwartz and Ahmad, 2005; Linger and Tyler, 2007). Cependant, ce mécanisme suit des voies bien différentes (Tagami et al., 2004), l'octamère d'histones "coeur" étant notamment échangé avec des variantes d'histones (Schwartz and Ahmad, 2005).

L'assemblage de la chromatine assure la survie et le maintien du statut épigénétique des cellules eucaryotes. En effet, suite à la réplication de l'ADN, lors de la phase S, l'ADN nu est une cible à la merci de chaque protéine liant l'ADN dans la cellule. Par conséquent, l'assemblage de la chromatine dépendante de la réplication est un processus vital au sein de la cellule. En effet, celui-ci permet d'établir une conformation silencieuse de la chromatine prévenant l'expression de gènes aberrants (Loyola and Almouzni, 2004).

La duplication du génome nécessite que les protéines de la machinerie de réplication se lient à l'ADN. Tout d'abord, le double brin d'ADN est séparé par le complexe hélicase MCM (MiniChromosome Maintenance) suivi par le passage de diverses ADN polymérases sur l'ADN simple brin. La protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), par sa structure en anneau, encercle l'ADN, et maintient l'ADN polymérase fixé à l'ADN (Ransom et al., 2010). Pour permettre le passage de l'hélicase, de PCNA et des polymérases, l'ADN doit être exempt de nucléosomes (**Figure 5**). Ainsi, les dimères H2A-H2B et H3-H4 sont dissociés de la chromatine par des chaperones d'histones au niveau de la fourche de réplication. Cependant, comme l'assemblage et le désassemblage de la chromatine sont des processus intrinsèquement liés, il est difficile de distinguer le rôle des chaperones d'histones dans l'un ou l'autre de ces processus *in vivo*. Certaines données montrent toutefois un rôle du complexe FACT (Facilitates Chromatin Transcription) dans la dissociation des dimères H2A-H2B et des dimères H3-H4 durant la réplication (Winkler and Luger, 2011) en raison de ses fonctions dans la dissociation des nucléosomes lors de l'élongation de la transcription (Belotserkovskaya et al., 2003) (**Figure 5**). Cependant, les chaperones d'histones sont généralement spécifiques de l'un ou l'autre des dimères. En effet, une autre chaperone d'histones pourrait être impliquée dans le retrait d'H2A-H2B, NAP1 (Nucleosome Assembly Protein 1) (Ito et al., 1996). Une fois H2A-H2B retirés de la chromatine, les dimères H3-H4 pourraient être enlevés de la chromatine par ASF1 (Antisilencing Function 1) (Adkins and Tyler, 2004) (**Figure 5**).

Lors de sa synthèse, l'ADN serait rapidement réassemblé en chromatine dès que sa longueur est suffisante pour s'enrouler autour d'un octamère d'histones (Sogo et al., 1986). La déposition des histones recyclées et néosynthétisées implique des complexes différents se faisant dans tous les cas de manière séquentielle. Deux dimères H3-H4 sont déposés, puis

deux dimères H2A-H2B, suivis par l'incorporation de l'histone de liaison H1 si nécessaire. Comme les histones recyclées et néosynthétisées s'incorporent apparemment de façon aléatoire aux deux brins d'ADN, l'étape de réplication est réalisée de manière semi-conservative (Annunziato, 2005). Ainsi, l'information épigénétique est transmise à la cellule fille. L'incorporation des dimères H3-H4 nouvellement synthétisés est spécifiquement réalisée par les chaperones d'histones CAF-1 (Chromatin Assembly Factor 1) et Rtt106 grâce à des motifs particuliers de modifications portés par ces histones. Par exemple, l'acétylation de H3-K56 améliore l'affinité du dimère pour ces chaperones d'histones et facilite sa déposition après réplication de l'ADN (Li et al., 2008). Il est intéressant de noter que ASF1 est requise pour acétyler ce résidu en présentant un dimère H3-H4 à l'acétyltransférase Rtt109 (Tsubota et al., 2007). De plus H3-K56Ac pourrait faciliter le bon positionnement du nucléosome lors de la maturation de la chromatine car cette marque participe à la déstabilisation des nucléosomes. H3K56Ac est ensuite désacétylé quand les nucléosomes ont trouvé leur position idéale (Masumoto et al., 2005; 2005). En plus de l'acétylation de H3-K56, les histones nouvellement synthétisées sont acétylées sur leurs queues N-terminales aux positions K5 et K12 pour H4 ainsi que K9 et K14 pour H3 (Loyola et al., 2006; Jasencakova et al., 2010). L'implication fonctionnelle de ces modifications dans l'incorporation des histones à la chromatine n'est pas bien comprise. Pour résumer, les histones néosynthétisées sont déposées grâce au concours de différents complexes macromoléculaires contenant entre autre les chaperons d'histones CAF-1, ASF1, et Rtt106 (**Figure 5**). Cependant, la compréhension des réseaux de coopération de ces protéines reste limitée. L'autre moitié des histones assemblées à l'ADN provient de la chromatine parentale. Les chaperones d'histones impliquées dans ce processus ne sont pas encore connus. Une fois le tétramère (H3-H4)₂ incorporé à la chromatine, deux dimères de H2A-H2B sont déposés de part et d'autre. Les chaperones d'histones FACT et NAP1 permettent le retrait de ce dimère mais on ne sait pas si elles sont aussi impliquées dans sa déposition. Enfin, l'histone de liaison H1 est incorporée à la chromatine. Cette étape semble requise pour la fin de la phase S et serait probablement réalisée par la chaperone d'histone NASP (Nuclear Autoantigenic Sperm Protein) (Finn et al., 2008).

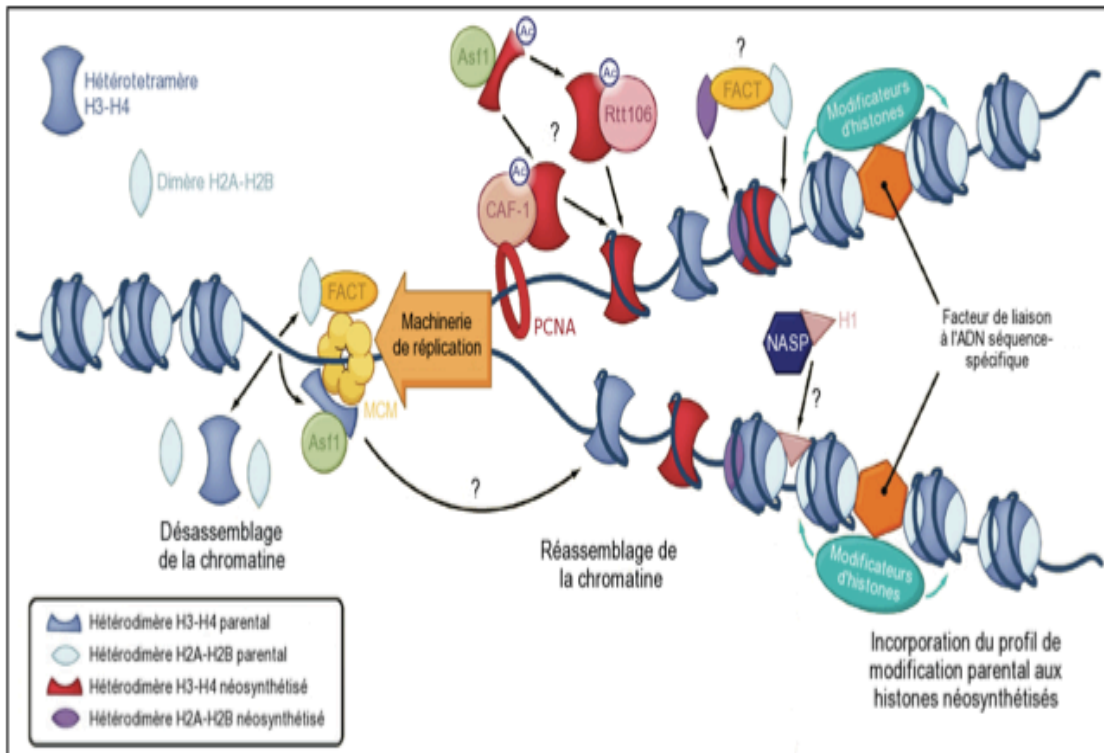


Figure 5. Modèle d'assemblage et de désassemblage de la chromatine (D'après Ransom et al., 2010).

2.1.2.2. Chromatine et transcription

Le moment de la réplication de l'ADN diffère selon la chromatine considérée. On considère deux états fonctionnels de la chromatine, l'euchromatine, représentant un état de chromatine lâche, et l'hétérochromatine, ayant les caractéristiques d'une chromatine dense et compacte (**Figure 6**). En effet, au cours de la phase S, l'euchromatine se réplique avant l'hétérochromatine (Schübeler et al., 2002; Woodfine et al., 2004). Cette différence peut s'expliquer par le fort degré de compaction de l'hétérochromatine qui serait un frein à l'accès de la machinerie de réplication. Elle n'est, cependant, pas la seule à avoir quelques difficultés à se frayer un chemin vers l'hétérochromatine. En effet, un des aspects les plus importants concernant l'hétérochromatine réside dans le fait qu'elle ait été longtemps considérée comme une région transcriptionnellement inerte.

L'euchromatine correspond à l'état de chromatine décondensée formée de fibres de 10 nm de diamètre et a été décrite comme associée à une transcription active des gènes (**Figure 6**). Elle est largement composée de séquences codantes qui correspondent à moins de 4% du génome des mammifères. Elle est très déspiralisée, hyperacétylée, hypométhylée et donc

facilement accessible à la machinerie de transcription. L'hétérochromatine est surnommée dès 1970 de « garbage DNA » ou « junk DNA », délestée de fonction éventuelle, qualifiant ainsi cet ADN de déchet génomique (Dover, 1980; Orgel and Crick, 1980). En effet, le haut degré de condensation de l'hétérochromatine suggère qu'elle demeure relativement inaccessible aux facteurs de transcription. On distingue deux sous-catégories d'hétérochromatine, en fonction de leur stabilité : l'hétérochromatine constitutive ou l'hétérochromatine facultative (**Figure 6**). L'hétérochromatine constitutive correspond à une chromatine silencieuse stable très dense en éléments répétés de l'ADN comme des séquences satellites et des éléments transposables (Birchler and Bhadra, 2000). La zone la plus fortement concernée est la constriction primaire des chromosomes, le centromère. Les régions entourant le centromère, appelées péricentromères, sont également enrichies en hétérochromatine constitutive. Enfin les régions télomériques (extrémités des chromosomes), et les bras courts des chromosomes acrocentriques sont également composés d'hétérochromatine constitutive (Taddei et al., 2004). Ce type d'hétérochromatine est localisée en périphérie du noyau et dans le nucléole et est maintenue condensée tout au long du cycle cellulaire. L'exemple le plus connu de cet effet de position est celui du gène *white* chez la drosophile qui, suite à une inversion sur le chromosome X, se retrouve à proximité de l'hétérochromatine péricentrique et devient réprimé, entraînant un mosaïcisme blanc-rouge de la couleur des yeux (Schultz, 1936; Henikoff, 1994). Chez les mammifères, les centromères et régions péricentromériques s'associent généralement entre eux, pour former des foyers appelés chromocentres (Taddei et al., 2004). L'hétérochromatine facultative représente des régions qui adoptent une conformation "ouverte" ou "fermée" en fonctions de contextes spatio-temporels (Trojer and Reinberg, 2007). Ainsi, elle est retrouvée aux loci régulés pendant le développement, où l'état de condensation de la chromatine est modifié en réponse à des signaux cellulaires et à l'activité de certains gènes. Ces types d'hétérochromatines assurent des fonctions essentielles dans le maintien de la stabilité génomique. Un des exemples les plus caractéristiques illustrant ce type d'hétérochromatine est le corpuscule de Barr. En effet, l'inactivation du chromosome X est réversible dans les cellules germinales (Lyon, 1962; Brown and Chandra, 1973). La formation de l'hétérochromatine est un moyen de réprimer spécifiquement certaines régions du génome, et participe ainsi à l'élaboration d'un programme génétique propre à chaque cellule. Les différents niveaux de condensation de l'ADN définissent des domaines chromatinien au sein des cellules eucaryotes.

L'organisation des domaines chromatinien en boucles larges (300-700 nm) se produit par l'attachement de la fibre chromatinienne aux périphéries du noyau et aux protéines

d'échaffaudage. L'association de ces domaines chromatinien à des régions nucléaires particulières peut aboutir à la formation de territoires chromosomiques (**Figure 6**). Certaines données semblent indiquer des corrélations entre les territoires chromosomiques et la transcription active ou réprimée des gènes. En effet, Osborne et ses collègues ont montré une colocalisation dynamique des gènes transcrits avec les sites actifs de transcription (Osborne et al., 2004). De plus, plusieurs travaux suggèrent une corrélation entre la disposition spatiale de régions riches en gènes et leur transcription. Ces régions préférentiellement transcrites ont une tendance à se retrouver en périphérie nucléaire, et le plus souvent exclues des « territoires chromatinien » localisés au centre du noyau (Mahy et al., 2002). Enfin, Finlan et ses collègues ont montré que la relocalisation forcée d'une région chromatinienne en extrême périphérie nucléaire semblait au contraire réprimer la transcription des gènes ciblés (Finlan et al., 2008).

Le nucléole constitue un compartiment chromatinien particulier : la transcription des gènes ribosomiaux est regroupée en son centre, dit composant fibrillaire. La structuration des ARN ribosomiaux (ARNr) s'effectue à proximité, dans le compartiment fibrillaire dense et la maturation finale des ribosomes a lieu dans la zone extérieure du nucléole, à savoir le compartiment granulaire (Shaw and Jordan, 1995; Raska, 2003).

Les télomères, situés aux extrémités des chromosomes, adoptent une structuration particulière qui protège l'ADN des cassures doubles-brins et donc de la machinerie de réparation. Chez la levure, les télomères se regroupent en quelques foyers présents à proximité de l'enveloppe nucléaire (Funabiki et al., 1993; Gotta et al., 1996). Chez les mammifères, les télomères seraient distribués de manière aléatoire au sein du noyau (Ludérus et al., 1996). Cependant, des études ont montré une association transitoire de deux ou trois télomères dans des fibroblastes humains (Molenaar et al., 2003). L'enveloppe nucléaire interagit avec la chromatine et est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes. L'inactivation du gène codant un de ses principaux constituants, la lamine A, conduit à une désorganisation de l'hétérochromatine centromérique. Le corpuscule de Barr, résultant de la compaction du second chromosome X chez la femme, est quant à lui retrouvé systématiquement en périphérie du noyau. Les centromères, situés au centre des chromosomes, sont spécialisés dans la ségrégation fidèle des chromosomes lors de la division cellulaire et possèdent des signatures moléculaires caractéristiques comme l'hypoacétylation des histones et la présence du variant H3.3. CENP-A (Centromere Protein A) (Shuaib et al., 2010).

Le phénomène de la mitose est également un processus nécessitant une réorganisation structurelle et spatiale de la chromatine. Après s'être condensés en une structure chromatinienne extrêmement compacte, les chromosomes s'alignent au niveau de la plaque équatoriale. Les chromatides sœurs qui composent le chromosome sont soudées au niveau de leurs centromères grâce à la cohésine et les kinétochores qui se forment au niveau des centromères vont pouvoir se connecter aux microtubules suite à la dissociation de l'enveloppe nucléaire. Les chromatides sœurs vont alors pouvoir être séparées et déplacées aux deux pôles de la cellule et se décondenser une fois la mitose terminée pour permettre l'expression des gènes nécessaires aux deux cellules filles. Enfin, les récents travaux de l'équipe d'A. Dernburg sur *Caenorhabditis elegans* démontrent que l'appariement des chromosomes méiotiques homologues permettant la formation des complexes synaptonémaux requérait une connexion avec le réseau intègre de microtubules (Dernburg et al., 1998). Ainsi, il semblerait que l'organisation spatiale de la chromatine puisse être contrôlée directement pas le cytosquelette depuis l'extérieur du noyau.

Cette plasticité de la chromatine, et la régulation de l'expression des gènes qui en découle, est l'information épigénétique qui est véhiculée par différents types de marques de la chromatine, capables d'être modifiés, décryptés et d'engranger différents processus cellulaires précis.

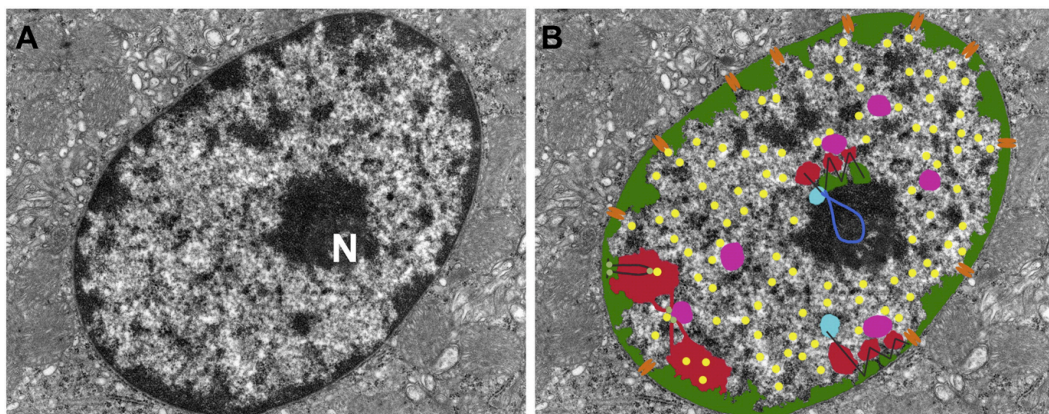


Figure 6. Les territoires euchromatiques et hétérochromatiques (d'après Fedorova et al., 2008). (A) Image du noyau d'une cellule pariétale (estomac de rat) obtenue par microscopie électronique à transmission conventionnel. (B) L'hétérochromatine apparaît en noir (N: Nucléole). (D'après le Dr. Jastrow <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMAtlas.html>). Les arrangements typiques de la chromatine et des autres composants nucléaires. L'hétérochromatine périnucléaire est mise en évidence en noir-vert. L'hétérochromatine périnucléaire ne couvre pas les pores nucléaires (orange). Les territoires chromosomiques affichent une

organisation polaire. Les domaines riches en AT/pauvres en gènes (noir-vert) sont associés avec les périphéries nucléaires et nucléolaires et contribue à l'hétérochromatine. En contraste, les domaines riches en gènes/riches en GC (rouge) sont orientés vers l'intérieur nucléaire et contribue à l'euchromatine. L'organisation polaire est basé sur un arrangement zig-zag des différents domaines chromosomiques et le chemin en zig-zag de l'épine dorsale des chromosomes entre les différents domaines est indiqué en noir dans deux des territoires chromosomiques (au milieu). L'hétérochromatine péricentrique (bleu clair) peut donner lieu à des chromocentres et des îlots hétérochromatiques à l'intérieur nucléaire, mais contribue également à l'hétérochromatine périnucléaire et périnucléolaire. La région organisatrice du nucléole portant les chromosomes sont généralement associés aux nucléoles et l'ADN ribosomique (bleu foncé). Les régions d'épissage (rose), les domaines de transcription actif (jaune), et les loci actifs (jaune) ne se trouvent pas au sein de l'hétérochromatine, mais présents au sein des territoires chromosomiques.

2.2. La machinerie de transcription eucaryote

2.2.1. Généralités sur les ARN polymérases

On a découvert, il y a plus de 50 ans, dans les cellules de mammifères, l'existence d'une activité ARN polymérase ADN-dépendante (Weiss and Gladstone, 1959). Cette nouvelle activité enzymatique fut prédite précédemment par les notions de transcription et d'ARN, qui postulaient que, tous les ARNs sont comme la copie fidèle d'un brin complémentaire de l'ADN.

L'ARN polymérase fut d'abord étudiée chez la bactérie *Escherichia coli*, dans lequel, cette enzyme est de grande taille (500kD), et est faite d'une « core enzyme » catalytique de structure $\alpha_2\beta\beta'\omega$, se combinant à une famille de facteurs σ assurant la reconnaissance des promoteurs (Chamberlin, 1962; Zhang et al., 1999). Dix ans après la découverte de Weiss et Gladstone, on a pu se rendre compte de la situation plus complexe de l'ARN polymérase chez les eucaryotes. R. Roeder et ses collègues ont, en effet, séparé l'activité enzymatique humaine en trois fractions protéiques distinctes (Roeder and Rutter, 1969; Novello and Stirpe, 1970). Au même moment, C. Kedinger et ses collaborateurs distinguaient également chez les eucaryotes trois enzymes selon leur sensibilité à l' α -amanitine (Kedinger et al., 1970).

Depuis, trois formes d'ARN polymérases nucléaires ont été bien caractérisées chez la levure, et identifiées dans les cellules animales et végétales (Sentenac, 1985). Il existe également une quatrième ARN polymérase (PolIV) découverte chez les plantes (Larminie et al., 1997; Sutcliffe et al., 1999; Cheetham and Steitz, 2000; Desai et al., 2005; Haurie et al.,

2010). Enfin, Il existe, un second type d'ARN polymérase monomérique, assurant la transcription de l'ADN mitochondrial chez l'immense majorité des eucaryotes, contribuant à la transcription chloroplastique et intervenant également dans certaines transcriptions phagiques (Cheetham and Steitz, 2000).

Ainsi, chez tous les eucaryotes, la transcription de l'ADN nucléaire est effectuée par trois ARN polymérases, appelées PolI, PolII, et PolIII, comprenant respectivement 14, 12 et 17 sous-unités et un poids moléculaire respectif de 589, 514 et 693 kD. 10 sous-unités forment un cœur structurellement conservé, et les sous-unités additionnelles sont situées à la périphérie du cœur. Des études structurales détaillées ont pu montrer, que la région active et les protéines associées sont similaires chez ces trois enzymes, et que les principales différences se situent au niveau de la fonction des gènes transcrits par telle ou telle polymérase (Willis, 1993).

Chaque ARN polymérase catalyse la transcription d'un ensemble spécifique de gènes. La PolI synthétise de façon active un transcrit unique, le précurseur de l'ARN ribosomique (pré-ARNr), qui évolue ensuite en ARN ribosomique (ARNr) 28S, 5,8S, et 18S. La variété de transcrits synthétisée par la PolII est extrêmement complexe, parce que ceci inclut tous les ARN messenger (ARNm) codant pour les protéines et beaucoup d'ARN non codant pour les protéines (ARNnc), comme les petits ARN nucléaires (ARNsn), les petits ARN nucléolaires (ARNsno) et les micros ARN (ARNmi) (Dieci et al., 2007).

La PolIII est conceptuellement souvent associée avec la PolI puisqu'elle synthétise activement un petit ensemble d'ARN infrastructuraux. En effet, les produits les plus abondants de la transcription PolIII sont les différentes espèces d'ARNt (ARN de transfert) et l'ARNr5S (ARN ribosomique 5S) qui, comme les ARNs synthétisés par la PolI, sont des composants fondamentaux de la machinerie de synthèse des protéines. Le rôle clé de la PolIII dans la synthèse protéique obscurcit le fait que la PolIII transcrit aussi un nombre significatif d'autres ARN non codants avec des fonctions peu connues (Geiduschek, 1988; WILLIS, 1993). Cette faible connaissance du transcriptome PolIII nous suggère que les transcrits non-ARNt, et non-ARNr sont des produits exotiques d'un système de transcription centré sur le ribosome. Seulement, l'augmentation du nombre et de la diversité fonctionnelle des gènes transcrits par la PolIII ainsi que l'intégration de nouvelles informations à d'anciennes conceptions nous permet de penser à présent que la régulation génique de la PolIII peut être aussi complexe que la transcription dépendante de la PolII.

2.2.2. Transcription initiée par l'ARN polymérase III

2.2.2.1. Les gènes de classe III

L'augmentation du niveau de compréhension des processus de régulation fournit une image plus complexe du rôle des transcrits PolIII dans la cellule (Dieci et al., 2007).

Beaucoup de ces transcrits ont des fonctions essentielles dans la biosynthèse protéique, comme les ARNt et l'ARNr5S faisant partis de la machinerie de traduction du ribosome, comme l'ARN RNase P impliqué dans la maturation des pré-ARNt, ou encore l'ARN RMRP (RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease) et les ARNsno jouant un rôle dans la maturation des ARNr. D'autres transcrits PolIII sont capables de réguler la transcription et la traduction. L'ARN 7SK chez les vertébrés réprime l'élongation de la PolII, et l'ARNsn U6 facilite l'épissage post-transcriptionnel. L'ARN 7SL prend part aux événements post-traductionnels de la synthèse protéique en étant impliqué dans le transport intracellulaire des protéines. De façon consécutive, les ARN BC1 et BC200 sont impliqués dans la traduction des ARNm dendritiques chez les rongeurs et les primates. Les ARN VA (Viral Associated) (VA-I ; VA-II) codés par les adénovirus sont également synthétisés par la PolIII, et servent à diversifier la machinerie traductionnelle d'une cellule infectée vers une production effective de protéines virales. Les transcrits PolIII se localisent aussi dans la mitochondrie. L'ARN RNase MRP est, par exemple, associé avec l'ARN jouant un rôle dans la maturation de l'amorce durant la réplication de l'ADN mitochondrial. Les autres gènes de classe III codent pour des transcrits sans fonction connue. Cette catégorie inclut les familles des gènes 7SK, des SINEs (Short Interspersed Repeated DNA Elements), constituant la majorité des séquences ADN pour la transcription PolIII (Dieci et al., 2007) (**Figure 7**).

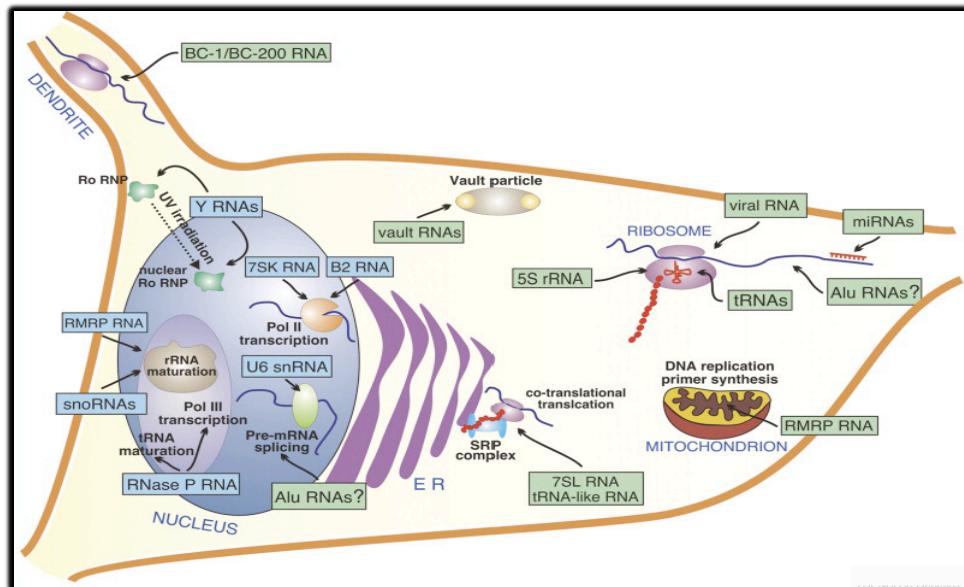


Figure 7. Le transcriptome PolIII (d'après Dieci et al., 2007). Les transcrits PolIII agissant au niveau du noyau et du cytoplasme sont respectivement en bleu et en vert. Une flèche indique le rôle cellulaire de différents ARN synthétisés par la PolIII dans le processus cellulaire.

Les SINEs sont des séquences non codantes de 80 à 400pb (Coffin et al., 1997; Deininger and Batzer, 2002; Weiner, 2002). Chez la souris, les SINEs sont représentés par B1 et B2 (Allen et al., 2004) et chez l'Homme, ce sont les éléments Alu qui constituent la plus grande famille (Schmid, 1998; Rowold and Herrera, 2000; Batzer and Deininger, 2002). Chaque copie est approximativement longue de 300 nucléotides et partage une similarité de séquence avec le gène de l'ARN 7SL, qui génère le composant ARN de la particule de reconnaissance du signal (SRP, un complexe ribonucléique permettant la translocation de protéines naissantes contenant les peptides signaux). Les études phylogénétiques ont montré que les éléments Alu dérivent de ce gène, et ont évolué par des délétions internes, par l'acquisition d'une voie 3' poly-A, et par une duplication consécutive en tandem (Quentin, 1992). L'acquisition de la structure dimérique, qui a eu lieu il y a environ 60 millions d'années, a marqué le début de l'amplification à haute fréquence des séquences Alu dans le génome des primates. Aujourd'hui on considère près d'un million d'exemplaires de ces éléments dans le génome humain. Les éléments Alu ont conservé la structure secondaire, qu'ils ont hérité, du gène de l'ARN 7SL, en dépit de leur longue et indépendante évolution (Sinnott et al., 1991; Bovia and Strub, 1996). Ces éléments sont aussi responsables principalement des insertions *de novo* causant des maladies chez l'Homme, à la fois dans les tissus somatiques et dans la lignée germinale (Deininger and Batzer, 1999). Les calculs

effectués à partir des cas observés indiquent que l'insertion d'un nouvel élément Alu survient généralement pour une naissance sur 100, les rendant avec les LINEs (Long Interspersed Repeated DNA Elements) (Kazazian, 1999), les mutagènes endogènes humains les plus puissants. Bien que les SINEs contiennent un promoteur interne, ils leur manquent une séquence codante, de sorte qu'ils dépendent d'autres éléments pour leur transposition. Les candidats les plus probables pour recruter la machinerie de transposition des séquences Alu sont les éléments provenant de la famille humaine des LINEs (L1) (**Figure 8**). Cette famille contient une région non-traduite 5' (5' UTR) avec un promoteur interne qui dirige l'initiation directe de la transcription de l'élément L1, et deux séquences distinctes codant pour les protéines ORF1 et ORF2 nécessaire au processus de rétrotransposition (Swergold, 1990). La structure du promoteur interne a du sens pour un rétroposon, qui doit amener son promoteur avec lui pour générer une copie active quand il est inséré à un nouvel endroit (**Figure 8**). Dans ce sens, le promoteur de L1 ressemble au promoteur des gènes ARNt eucaryotiques, qui sont transcrits par la PolIII (Paule and White, 2000), mais la prépondérance des résultats, incluant la capacité de l'ARN à coder pour une protéine, la queue poly(A), et l'inhibition *in vivo* à l' α -amanitine, suggère que les transcrits LINEs, ORF1, et ORF2, sont codés par la PolII (Woodcock et al., 1996). A l'intérieur de la séquence 5' UTR transcrite par la PolIII, des sites de liaison à des facteurs de transcription ont été découverts, SRY (Sex-determining Region Y) (Tchénié et al., 2000), RUNX3 (Runt-related transcription factor 3) (Yang et al., 2003; 2003), YY1 (Yin Yang 1) (Athanihar et al., 2004), suggérant l'importance de ce site pour l'activation et l'initiation transcriptionnelle des LINEs. Seulement ces facteurs de transcription sont spécifiques de la lignée germinale, il se peut donc que d'autres facteurs de transcription soient nécessaires pour la transcription de ce domaine. L'expression des SINEs est normalement basse mais peut être augmentée par le stress cellulaire, le choc thermique, et l'infection virale. L'ARN murin B2 peut inhiber la transcription en se liant directement à la PolII, et les ARN Alu peuvent moduler la traduction protéique et réguler de façon négative l'expression protéique à travers un effet anti-sens (Allen et al., 2004).

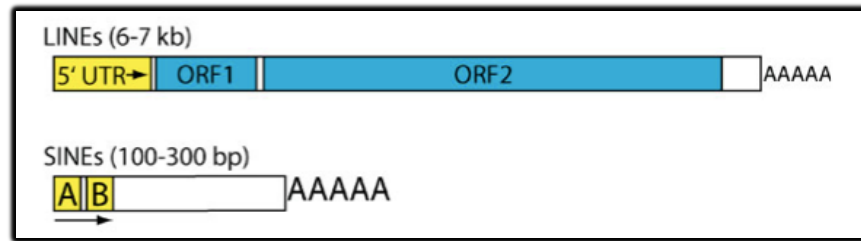


Figure 8. Structure primaire des séquences nucléiques des SINEs et des LINEs (D'après Han et al., 2005).

2.2.2.2. L'ARN polymérase III

La PolIII est la plus grande des ARN polymérases nucléaires, avec un poids moléculaire de 600-700 kD. Ceci peut être surprenant puisque la PolII transcrit un ensemble beaucoup plus vaste et plus diversifié de modèles, alors qu'on aurait pu s'attendre à une plus grande complexité.

2.2.2.2.1. Caractérisation biochimique

Historiquement, les trois ARN Polymérases eucaryotes I, II et III étaient respectivement appelées A, B et C. Toutes les trois ont des structures globales similaires plus complexes que l'ARN Polymérase bactérienne de structure $\alpha\alpha'\beta\beta'\omega$. En effet, chaque ARN Polymérase eucaryote est une multiprotéine composée de deux grands sous-unités, homologues aux sous-unités bactériennes β et β' , et qui sont toujours associées à des sous-unités plus petites. La PolIII (693 kD) est composée de 17 sous-unités, conservées de la levure à l'homme, cinq sont communes aux trois Pols (ABC27, ABC23, ABC14,5, ABC10 α et ABC10 β), deux autres, seulement, sont partagées avec la Pol I (AC19 et AC40), cinq sont homologues à des sous-unités de la PolII et/ou II (C160, C128, C25, C17 et C11) et les cinq dernières sont vraisemblablement spécifiques à la PolIII (C82, C53, C37, C34 et C31) (Geiduschek and Kassavetis, 2001; Huang and Maraia, 2001; Schramm and Hernandez, 2002; Carter and Drouin, 2010). On peut toutefois noter que les sous-unités C53 et C37 présentent une faible homologie de séquence avec le facteur d'initiation TFIIF de la PolII. De même, les sous-unités C82 et C34 pourraient être apparentées aux sous-unités α et β du facteur d'initiation TFIIE (Transcription Factor II E).

La structure cristallographique de la PolIII n'est pas totalement identifiée mais la localisation des sous-unités de la PolIII (Flores et al., 1999) et l'obtention du cristal de la Pol

II, qui partage des sous-unités homologues au complexe multiprotéique de la PolIII (Geiduschek and Kassavetis, 2001; Cramer, 2006), ont permis de proposer un modèle de structure de la Pol III (**Figure 9**). Ce modèle a été affiné grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse et de la cryo-microscopie électronique (Fernández-Tornero et al., 2007). La PolIII posséderait un cœur de dix sous-unités similaires à celui retrouvé dans la Pol II (Cramer and Bushnell, 2001; Armache et al., 2005), duquel dépasse le sous-complexe C17/C25, qui est impliqué dans l'initiation de la transcription via la reconnaissance des facteurs de transcription et dans la fixation du transcrit naissant (DEZELEE 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 and Roeder, 1997), localisé au-dessus du sillon central du complexe entier où se loge l'ADN (Fernández-Tornero et al., 2007). C53 et C37 forment un hétérodimère qui interagit avec le sous-complexe C82/C34/C31 pour ouvrir l'ADN au niveau du promoteur (Kassavetis et al., 2010) et 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 le phénomène de réinitiation. 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) (**Figure 9**).

Chez l'homme, il existe deux isoformes de l'ARN Pol III, selon qu'elle contienne la sous-unité RPC32 α (ARN Pol III α) ou RPC32 β (ARN Pol III β). La forme β est considérée comme la forme générale de l'ARN Pol III, la forme α est exprimée dans des types cellulaires spécifiques et de manière intéressante dans les cellules indifférenciées (Haurie et al., 2010).

Les sous-unités C17 et C25

C25 est une sous-unité hautement conservée de la PolIII présentant une homologie avec Rpa43 (PolII), Rpb7 (PolIII) et RpoE (ARN polymérase des archées) (Sadhale and Woychik, 1994; Shpakovski and Shematorova, 1999). C17 est une des dernières sous-unités identifiées comme faisant partie du complexe PolIII (Ferri et al., 2000). En contraste avec C25, l'identification de C17 comme homologue de Rpb4 dans le système PolIII est venu plus tard (Siaut et al., 2003). Bien que C17 soit bien conservé entre les différentes espèces, cette sous-unité montre une faible conservation de séquence avec ses homologues des autres polymérases (Siaut et al., 2003). Dans la PolII et l'ARN polymérase des archées, C17 est homologue à Rpa14 et RpoF, respectivement (Peyroche et al., 2002; Meka et al., 2003). Les sous-unités PolIII C25 et C17 forment un sous-complexe hétérodimérique similaire aux paralogues PolIII Rpb7 et Rpb4.

Comme toutes les sous-unités de la PolIII, C17 et C25 sont essentielles à la viabilité des levures (Sadhale and Woychik, 1994; Ferri et al., 2000). De façon similaire à Rpb4/7, le sous-complexe C17/25 est impliqué dans l'initiation de la transcription reconnaissant les facteurs liés aux promoteurs, mais n'est pas requis pour l'élongation ou la terminaison de la transcription (Zaros and Thuriaux, 2005). C17 interagit avec la partie N-terminale de Brf1, une des sous-unités du facteur d'initiation de la transcription TFIIB, et avec la sous-unité C31 de la PolIII (Ferri et al., 2000), requise également pour l'initiation de la transcription (Werner et al., 1992; Wang and Roeder, 1997).

Les sous-unités C31, C34 et C82

C31, C34 et C82 forment un sous-complexe stable chez la levure et les hommes (Werner et al., 1992; Wang and Roeder, 1997). C31 fait un pont entre le dimère C82/34, le cœur PolIII et le sous-complexe C17/25 (Lorenzen et al., 2007). C31/34/82 semble être impliqué dans la reconnaissance du promoteur spécifique et est donc requis pour l'initiation d'une transcription spécifique (Thuillier et al., 1995). La cartographie de C34 révèle que sa position est plus en amont sur le promoteur que toutes les sous-unités PolIII (Bartholomew et al., 1993). Ceci suggère un double rôle dans le recrutement de la PolIII et dans la formation d'un complexe ouvert (Brun et al., 1997). En cohérence avec cette observation, la sous-unité C34 interagit directement avec la sous-unité Brf1 de TFIIB, le facteur de transcription clé qui recrute la PolIII aux promoteurs spécifiques (Werner et al., 1993; Khoo et al., 1994; Andrau et al., 1999). De façon similaire, l'homologue humain de C34, hRPC39(RPC6), interagit avec la protéine humaine liant la boîte TATA, et hBrf1, toutes deux des sous-unités de TFIIB (Transcription Factor III B) humain (Wang and Roeder, 1997). C31 interagit avec C17, une autre sous-unité de la PolIII qui lie aussi Brf1 (Ferri et al., 2000). Ces interactions très fortes aident à la liaison de la PolIII sur le complexe de pré-initiation (Rao et al., 1983; Geiduschek and Kassavetis, 2001; Meka et al., 2003).

Les sous-unités C37 et C53

Les sous-unités C53 et C37 forment un hétérodimère associé de façon stable avec le cœur PolIII (Sassone-Corsi, 2002; Lorenzen et al., 2007; 2007), et sont présentes en quantité stoechiométrique. C37 et C53 sont homologues aux sous-unités de la PolI Rpa49 et Rpa34.5, respectivement (Landrieux et al., 2006). En se basant sur l'observation que des mutations, soit dans C37, ou C11, mènent à la perte de C53, C37 et C11 après la purification de la PolIII, il a

été proposé que le sous-complexe C53/37 forme une structure autonome avec C11 (Landrieux et al., 2006).

Des expériences avec un mutant de la PolIII, à qui il manque les sous-unités C53, C37 et C11, ont permis de mettre en évidence le rôle de ces sous-unités au cours de la transcription (Chow et al., 2005; Landrieux et al., 2006). Les sous-unités C53 et C37 ne sont pas requises pour le processus basal de la synthèse d'ARN mais semble être cruciales pour une terminaison efficace de la transcription. De plus, l'addition du complexe C53/37 réduit le taux d'élongation de la PolIII mutante par rapport au taux observé avec la PolIII sauvage. Ceci soutient qu'une pause naturelle au niveau du terminateur est importante pour la terminaison (Gusarov and Nudler, 1999; Bar-Nahum et al., 2005). La même étude montre que la reconnaissance correcte du terminateur n'est pas suffisante pour la réinitiation de la PolIII. Cette fonction importante est uniquement dirigée par la sous-unité C11 de la PolIII (Landrieux et al., 2006).

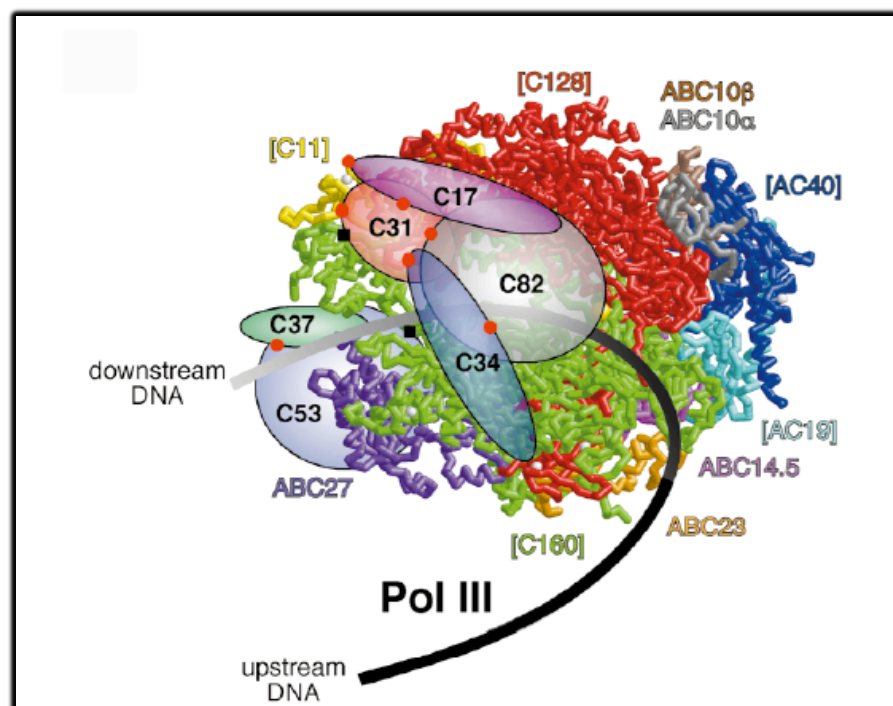


Figure 9. Composition de l'ARN polymérase III (D'après Geidushek et Kassavetis, 2001).

2.2.2.2. Les facteurs de transcription utilisés par l'ARN polymérase III

La transcription par la PolIII nécessite, en plus de la PolIII, des facteurs d'initiation de la transcription : TFIIA (Transcription Factor III A), TFIIB, et TFIIC (Transcription Factor III C). On a identifié ces facteurs de transcription lors de fractionnements protéiques réalisés à partir d'extraits de cellules humaines (Segall et al., 1980) et d'autres organismes dont la levure (Klekamp and Weil, 1982). La transcription reconstituée *in vitro* nécessite, en plus de la PolIII, les trois fractions protéiques contenant les activités de TFIIA, TFIIB, et TFIIC. Ces facteurs sont nécessaires à l'étape de pré-initiation et suffisants pour initier correctement la transcription par la PolIII mais il n'est pas exclu que les fractions protéiques contiennent d'autres constituants non essentiels impliqués dans la transcription (Andrau and Werner, 2001; Kassavetis and Steiner, 2006).

Au cours d'une transcription *in vitro*, la PolIII 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 : la PolIII ne possède pas de capacité intrinsèque de reconnaissance des promoteurs. Chez *S.cerevisiae*, l'initiation précise de la transcription est en effet dépendante des facteurs de transcription TFIIC, TFIIB et dans le cas de la transcription de l'ARNr5S, de TFIIA.

Le facteur TFIIA

Le facteur TFIIA (50 kDa chez *S. cerevisiae*) est une protéine spécifique de la transcription du gène de l'ARNr 5S (RDN5). Ce facteur joue un rôle d'adaptateur, d'intermédiaire, entre le facteur TFIIC et le promoteur spécifique du gène *rdn5*. TFIIA 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). TFIIA se lie à la boîte promotrice C du gène de l'ARNr 5S, et est indispensable à sa transcription (Camier et al., 1995; Kantor et al., 2003). Chez *S. cerevisiae*, le facteur TFIIA contient neuf doigts de zinc qui lui permettent de se lier à l'ADN. Les doigts de zinc 1 et 7 de TFIIA interviennent spécifiquement dans le recrutement de TFIIC (Rothfels et al., 2007).

Le facteur TFIIB

Le facteur TFIIB (200 kDa) est le facteur nécessaire au recrutement de la Pol III quel que soit le type de promoteur du gène. TFIIB n'est pas une entité moléculaire stable, puisque son activité peut être séparée par chromatographie en deux fractions nommées B' et B'' (Huet

et al., 1994; Kassavetis et al., 2010). Deux des sous-unités de TFIIB, Brf1 (TFIIB related factor 1) et TBP (TATA box binding protein), sont présentes dans la fraction B' (Margottin et al., 1991; Simmen et al., 1992; Lobo et al., 1992a) tandis que la troisième sous-unité, Bdp1 (TFIIB double prime 1), est présente dans la fraction B'' (Bartholomew et al., 1991).

Parmi les trois sous-unités de TFIIB, la protéine TBP a la particularité d'être un facteur commun aux polymérases I, II et III (Margottin et al., 1991; Bannister et al., 2002). TBP se lie à l'ADN, au niveau de la boîte TATA située en amont du site d'initiation des gènes, et contribue à la stabilité de la liaison du facteur entier TFIIB sur les gènes de classe III (Huet and Sentenac, 1992; Cheung et al., 2000). 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 le transcriptome PolIII (Teichmann et al., 2010).

Brf1 est une sous-unité importante dans la stabilité du complexe TFIIB/ADN et dans le recrutement de la PolIII au promoteur. La région N-terminale de Brf1 interagit non seulement avec TBP (Schroder et al., 2003) mais aussi avec TFIIC (Chaussivert et al., 1995; Wang and Roeder, 1995). D'ailleurs, cette partie N-terminale de Brf1 est homologue au facteur TFIIB, qui interagit de manière très comparable avec le facteur TFIID contenant TBP pour recruter la PolIII sur l'ADN (Orphanides et al., 1996; 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 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 TFIIB coexistent en fonction de la présence de Brf1 (TFIIB- β) ou de son isoforme Brf2 (TFIIB- α); le facteur humain TFIIB- β est requis pour les promoteurs de types 1 et 2 alors que le facteur TFIIB- α est celui nécessaire au recrutement de l'ARN Pol III sur le gène humain de l'ARNsn U6 (promoteur de type 3) (Teichmann and Seifart, 1995; Teichmann et al., 1997; McCulloch et al., 2000). Bdp1 est nécessaire à l'assemblage de TFIIB. Il interagit en effet *in vitro* avec le complexe TFIIC/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 la PolIII (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).

La sous-unité TFIIC

Chez *S. cerevisiae*, le facteur TFIIC (600 kDa) se compose de six sous-unités. Ce complexe protéique est 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, on a montré l'existence de deux domaines nommés τ A et τ B dans TFIIC (Marzouki et al., 1986). Le domaine τ A est composé des sous-unités τ 131, τ 95 et τ 55 tandis que le domaine τ B est composé des sous-unités τ 138, τ 91 et τ 60.

L'association spécifique et stable de TFIIC au promoteur intragénique de type 2 exige d'abord l'établissement d'une liaison forte entre τ B et la boîte promotrice B, puis une liaison faible de τ A à la boîte promotrice A (Marzouki et al., 1986; Deprez et al., 1999b; 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 τ 60 de τ B (Mylona et al., 2006).

Le facteur de transcription TFIIC humain est séparé par chromatographie en deux fractions, TFIIC1 et TFIIC2, toutes les deux requises pour la transcription du gène Ad2 VA-I (YOSHINAGA et al., 1987). Bdp humain est le composant majeur de TFIIC1 (Weser et al., 2004), par conséquent, TFIIC2 est le complexe protéique correspondant à TFIIC de la levure. TFIIC2 est constitué de 5 sous-unités, TFIIC220, TFIIC102, TFIIC110, TFIIC63, et TFIIC90 (**Figure 10**).

La sous-unité TFIIC220, l'homologue de τ 138 (Matsutani, 2004), ne se lie pas à l'ADN lui-même mais reconnaît la boîte B bien que l'ADN soit présent dans les sous-complexes TFIIC (Clark et al., 1991). Beaucoup de ces sous-complexes contiennent seulement la partie N-terminale de TFIIC220 et la sous-unité TFIIC110 ou un fragment de celle-ci. Ceci indique, que le domaine de liaison à l'ADN est localisé dans la région N-terminale de TFIIC220, et que TFIIC110 et TFIIC220 sont suffisants pour la liaison à l'ADN (Shen et al., 1996).

La sous-unité TFIIC110 correspond à la protéine de levure τ 91, bien que la similarité entre ces deux protéines soit seulement évidente quand ils sont comparés avec l'orthologue de *S. pombe* (Huang et al., 2000). TFIIC110 a une activité HAT (Histone Acetyl-Transférase),

et acétyle les histones libres H3 et H4, mais également les histones nucléosomales H3 et H4 aussi bien que l'histone nucléosomale H2B (Kundu et al., 1999).

La sous-unité TFIIC90 est l'homologue fonctionnel de $\tau 60$ puisqu'elle interagit avec TFIIC220, TFIIC110, et TFIIC63, aussi bien qu'avec la sous-unité de TFIIB, Brf1 (Hsieh et al., 1999). Par conséquent, $\tau 60$ /TFIIC90 fait le lien avec les sous-complexes τA et τB , aussi bien qu'avec TFIIB. De plus, TFIIC90 a une propriété intrinsèque, puisqu'elle a une activité HAT intrinsèque pour l'histone H3 nucléosomale, et acétyle préférentiellement la lysine 14 de l'histone H3 (Hsieh et al., 1999).

TFIIC102 et TFIIC63 sont les homologues respectifs de $\tau 131$ et $\tau 95$. TFIIC102 interagit avec TFIIC63, et les deux interagissent à la fois avec TBP et brf1 (Hsieh et al., 1999).

TFIIC		
H.sapiens	Partenaires ADN	Partenaires protéiques
TFIIC63	Boite A	TFIIC102 Brf1 TBP RPC62
TFIIC102	en amont du site d'initiation	Brf1 TBP TFIIC63
TFIIC220	Boite B	TFIIC110
TFIIC110	Boite B	TFIIC220
TFIIC90		TFIIC220 TFIIC110 TFIIC63 Brf1 RPC62 RPC39

Figure 10. Les sous-unités du facteur de transcription TFIIC. TFIIC est composé des 5 sous-unités TFIIC220, TFIIC110, TFIIC102, TFIIC90 et TFIIC63

2.2.2.3. Formation des complexes de transcription

2.2.2.3.1. Structure des promoteurs des gènes de classe III

Pour les différents types d'ARN transcrits, il existe trois principaux types de promoteurs spécifiques de la PolIII (Geiduschek and Kassavetis, 2001; Schramm and Hernandez, 2002; Dieci et al., 2007). Les promoteurs de la plupart des gènes transcrits par la PolIII incluent des régions de contrôle internes (ICRs) qui sont des structures intragéniques

discontinues composées de blocs de séquences essentielles séparés par des nucléotides non-essentiels. Les séquences ICRs sont hautement conservées entre les différents gènes et les différentes espèces.

Un des premiers promoteurs caractérisés de la PolIII est celui des gènes codant pour l'ARNr5S de *X. laevis* (Bogehagen et al., 1980; Sakonju et al., 1980; Schramm and Hernandez, 2002; Dieci et al., 2007). Il est classé comme étant le promoteur de type 1 et ses ICRs comprennent trois éléments distincts : une boîte A, un élément intermédiaire (IE) et une boîte C. Dans les promoteurs de type 1, l'ICR est reconnue par TFIIIA (Engelke et al., 1980; Sakonju et al., 1981). La formation du complexe TFIIIA-ADN permet la liaison de TFIIC (Lassar et al., 1983), et le recrutement consécutif de TFIIB, composé de TBP, Brf1 et Bdp1 (Bartholomew et al., 1991; Kassavetis et al., 1991). La liaison de TFIIB au promoteur permet ensuite le recrutement de l'ARN polymérase III (**Figure 11**).

La plupart des gènes de classe III, dans lesquels sont inclus les ARNt, les ARN VAs, Alu, EBER, 7SL, B1 et B2, ont des promoteurs de type 2 composé d'une boîte A et B intragéniques. La boîte A est localisée plus loin du site d'initiation dans les promoteurs de type 1 que dans ceux de type 2, et l'espace entre les boîtes A et les boîtes B varie en fonction de la localisation de l'intron. La force des promoteurs de type 1 et de type 2 est également affectée par des séquences extragéniques qui, en contraste avec les éléments promoteurs internes, montrent fréquemment peu ou pas de conservation. Dans le cas des promoteurs de type 2, les boîtes A et boîtes B sont reconnues directement par TFIIC (Lassar et al., 1983). Après la liaison de TFIIC, la voie de recrutement de la polymérase est similaire à celle des promoteurs de type 1, avec le recrutement consécutif de TFIIB et de l'ARN polymérase III (**Figure 11**).

Dans les promoteurs de type 3, comme ceux des gènes de mammifères U6 et 7SK, la transcription est indépendante d'éléments intragéniques et est dictée seulement par des éléments promoteurs externes (Murphy et al., 1986; DAS et al., 1988; KUNKEL and PEDERSON, 1988). Ils sont localisés dans la région 5' juxtante du gène et consiste en un élément de séquence proximal (PSE) et une boîte TATA en aval. L'expression des gènes dépendants du promoteur de type 3 est augmentée par un élément de séquence distal (DSE), qui contient des sites de liaison aux protéines. L'élément de séquence proximal (PSE) est reconnu par un complexe composé de multiples sous-unités appelées SNAPc (snRNA Activating Protein complex). La boîte TATA est reconnue par le composant TBP ayant une activité spécialisée TFIIB-like (Schramm et al., 2000; Teichmann et al., 2000). La liaison de SNAPc et l'activité TFIIB-like mène ensuite au recrutement de l'ARN polymérase III. De

façon intéressante, la voie de recrutement dans laquelle TFIIB est directement recruté sur une boîte TATA peut être observée *in vitro* avec TFIIB de *S. cerevisiae*. Ceci révèle un aspect profond de la transcription PolIII, à savoir que, TFIIB est suffisant pour recruter l'ARN polymérase et dirige quelques cycles de transcription. Par conséquent, TFIIA, TFIIC et SNAPc peuvent être vus comme facteurs de recrutement dont la principale fonction est de guider TFIIB aux différents promoteurs, qui sont capables ensuite de recruter l'ARN polymérase III. Ces trois promoteurs sont requis pour une transcription efficace *in vivo* (Brow and Guthrie, 1990; ESCHENLAUER et al., 1993) (**Figure 11**).

En plus de ces trois types décrits, il existe des promoteurs avec des éléments externes et internes (Dieci et al., 2000; Ouyang et al., 2000; Yukawa et al., 2000; Giuliodori et al., 2003). Un exemple d'un tel promoteur hybride est celui du promoteur du gène ARNsU6 de *S. cerevisiae*. Ce promoteur contient une boîte A et une boîte B localisées sur une position inhabituelle de 120 pb en aval de la région codante, et une boîte TATA localisée en amont du site de départ de la transcription (**Figure 11**).

Les éléments promoteurs internes

Le transcriptome PolIII utilise un large éventail d'éléments promoteurs dans la région de transcription. Pour la plupart des gènes de classe III, ce sont les boîtes A et boîtes B. La boîte B se trouve à une distance variable (de 30 à 60 pb) en aval de la boîte A, ce qui reflète le rôle de ces deux boîtes dans l'orientation du positionnement du facteur de transcription TFIIC. TFIIC dirige ensuite l'association du facteur de transcription TFIIB sur une séquence d'environ 50 pb en amont du site d'initiation de la transcription.

En plus de la boîte A, la transcription du gène de l'ARNr5S ne requiert non pas la boîte B, mais une boîte C et un élément intermédiaire, reconnue par le facteur de transcription gène-spécifique TFIIA. Beaucoup de gènes (comme les gènes codant pour l'ARN7SL et les ARN vault) ne sont pas strictement liés aux gènes codant pour les ARNt, ils possèdent des éléments promoteurs internes, des combinaisons boîte A-boîte B ARNt-like qui sont essentielles pour la transcription. Dans d'autres cas, comme RPR1 par exemple, les boîtes A et les boîtes B sont situées à l'intérieur d'une séquence transcrite qui a évolué à partir d'un transcrit mature. Quelquefois, une double boîte B est présente en combinaison avec la boîte A. Récemment, on a constaté que des boîtes B interagissent avec TFIIC et servent comme point de repère du génome qui empêche la diffusion de marques épigénétiques hétérochromatiques dans les génomes (Noma et al., 2006) (**Figure 11**).

Les éléments promoteurs en amont

Une fois associé de façon stable avec la région 5' juxtaposante, TFIIB recrute la PolIII et promeut l'initiation et la réinitiation de la transcription. Un composant clé de TFIIB, TBP, ou un facteur relié à TBP (TRF1 chez *D. melanogaster*) interagit avec l'ADN en amont, autour de la position -30. En conséquence, on trouve en amont, de beaucoup de gènes de classe III, une boîte TATA ou un élément de séquence TATA-like. L'élément TATA n'est pas seulement essentiel en amont de tous les gènes à qui il manque des éléments promoteurs internes (comme les gènes de l'ARN7SK), mais un élément TATA fonctionnel peut être également nécessaire en amont des gènes contenant la combinaison boîte A-boîte B. De manière cohérente, des motifs de séquence en amont centrés autour de la région interagissante avec TBP ont été retrouvés en amont des gènes ARNt chez beaucoup d'eucaryotes (Giuliodori et al., 2003). Un élément promoteur en amont bien caractérisé des gènes de classe III est PSE (Proximal Sequence Element) qui interagit avec un facteur composé de plusieurs sous-unités, appelé de façon variable, SNAPc (snRNA activating protein complex), PBP (the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein) ou PTF (Proximal sequence element-binding transcription factor) (Schramm and Hernandez, 2002). PSE est généralement localisé à environ 20 pb en amont de la boîte TATA. Dans les cellules humaines, SNAPc lié à PSE, facilite l'association d'un variant spécifique de TFIIB à l'ADN par l'intermédiaire de la boîte TATA.

Le niveau d'expression des gènes de classe III avec un promoteur complètement externe basé sur TATA/PSE est augmenté par la présence de DSE (Distal Sequence Element). DSE contient quelques sites de liaisons aux protéines, plus fréquemment un élément SPH et une séquence octamérique recrutant les facteurs de transcription STAF1 (Selenocysteine tRNA gene transcription activating factor 1) et Oct1 (Octamer 1), respectivement. Des sites de liaison en amont pour d'autres facteurs de transcription, comme SP1 (Specificity Protein 1) et ATF (Activating Transcription Factor) ont été trouvés sporadiquement pour stimuler la transcription de certains gènes de classe III (**Figure 11**).

L'élément terminateur

La PolIII est unique, car elle termine sa transcription par des résidus T (T>4 chez les vertébrés et T>5 chez la levure) en absence de facteurs accessoires (Braglia et al., 2005) (**Figure 11**).

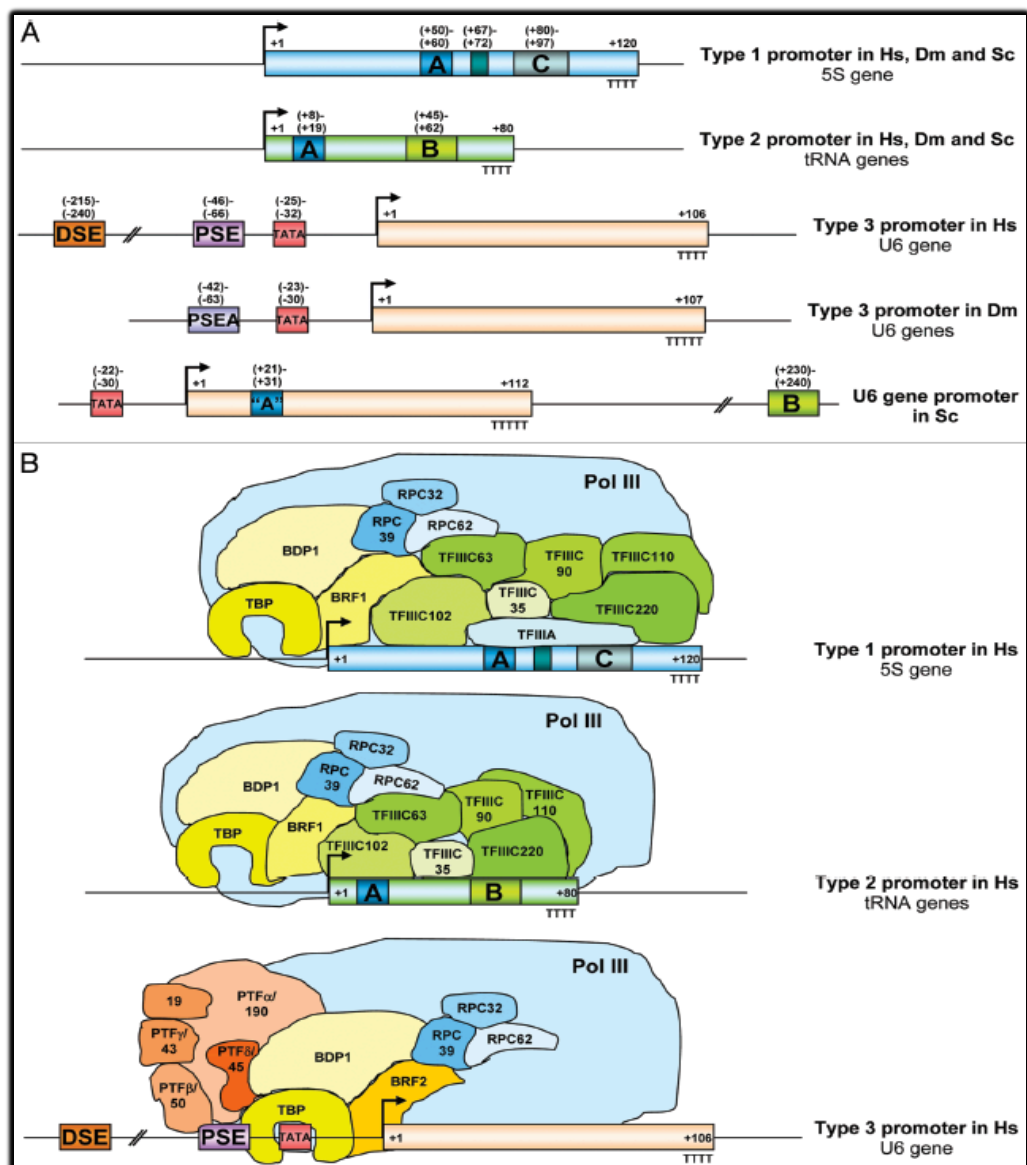


Figure 11. Les différents promoteurs de l'ARN polymérase III et ses composants (d'après Teichmann et al., 2010). (A) Les types de promoteurs de l'ARN polymérase III chez les Hommes (Hs), *Drosophila melanogaster* (Dm), et *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Les promoteurs de type 1 et 2 sont similaires, mais les promoteurs U6 sont différents dans les trois espèces. (B) Les promoteurs et les facteurs de transcription de la machinerie de transcription PolIII humaine.

2.2.2.3.2. Assemblage des complexes de transcription

La formation du complexe d'initiation de la PolIII a 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 Polymérase.

Toutefois, à ce modèle séquentiel s'oppose le modèle de type holoenzyme dans lequel la machinerie de transcription est pré-assemblée et fonctionnelle. En effet, on a observé l'existence de sous-complexes pré-assemblés de la machinerie de transcription PolIII (Wang et al., 1997; Lane et al., 2011). Chez *S. cerevisiae*, une holoenzyme fonctionnelle a pu être caractérisée mais dans une proportion très faible (moins de 1% des ARN Pol III) (Chédin et al., 1998). Cette holoenzyme pourrait, par conséquent, provenir d'un complexe de pré-initiation assemblé séquentiellement, et co-purifiée dans des conditions ménagées. Une autre hypothèse, expliquant la présence de sous-complexes pré-assemblés, suppose 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 (Geiduschek and Kassavetis, 2001).

2.2.2.4. La machinerie de transcription de l'ARN Polymérase III

2.2.2.4.1. Initiation

En comparaison avec les autres polymérases eucaryotiques qui requiert de nombreux facteurs de transcription pour former un complexe de pré-initiation stable, le système de la PolIII est assez simple. La voie d'assemblage pour la formation du complexe d'initiation dépend du type de promoteur (Schramm and Hernandez, 2002). L'étape de formation du complexe de pré-initiation est une étape cruciale de la transcription PolIII, puisqu'elle conduit à l'assemblage de l'ensemble des facteurs essentiels à l'initiation de la transcription, et permet donc de positionner correctement la PolIII sur ce site d'initiation.

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 va être stabilisée par l'association de TFIIIC (Keller et al., 1992).

Pour l'ensemble des autres gènes de classe III, chez *S. cerevisiae* par exemple, TFIIIC est le premier facteur recruté sur les séquences promotrices. Les sous-unités τ 138 et τ 91 du sous-domaine τ B coopèrent pour la liaison de TFIIIC à l'ADN (Arrebola et al., 1998). Les protéines τ 95 et τ 55 du sous-domaine τ A se positionnent ensuite respectivement près de, et à l'extrémité 3' de la boîte A. La sous-unité τ 55 est en contact direct avec τ 95 par son extrémité C-terminale (Manaud et al., 1998), tandis que τ 60 semble faire le pont entre les domaines τ A et τ B (Deprez et al., 1999b). Ensuite, τ 60 et τ 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). τ 131 est une protéine très structurée, formée d'une succession d'hélices α , 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 la PolIII, impliquant essentiellement TFIIIB. Le positionnement de la Pol III sur le 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 PolIII. Les sous-unités C82, C34 et C31 de la PolIII sont requises dans la reconnaissance du complexe TFIIIB/ADN (Werner et al., 1992; Thuillier et al., 1995; White et al., 1995). Ensuite, du côté de TFIIIB, sa sous-unité Brf1 interagit avec les sous-unités C34 et C17 de la PolIII (Werner et al., 1993; Khoo et al., 1994; Andrau et al., 1999; Ferri et al., 2000). Du côté de TFIIIC, la sous-unité τ 131 interagit avec les sous-unités C53 et ABC10 α de la PolIII tandis que la sous-unité τ 138 est en relation avec ABC10 α (Lefebvre et al., 1994; Dumay et al., 1999; Flores et al., 1999).

Une fois le complexe de pré-initiation correctement assemblée et la PolIII 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; 1992a). L'ARN Polymérase 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 PolIII 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 (Hecht et al., 1995; Edmondson et al., 1996; Bhargava and Kassavetis, 1999; Xue et al., 2000).

2.2.2.4.2. Elongation

Au cours de l'élongation, la bulle de transcription progresse sur le gène et la PolIII 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 nucléotides par seconde. 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 la PolIII 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 and 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 τA puis τB au cours du passage de la Pol III. Une autre observation *in vivo* suggèrent l'exclusion de TFIIC sur l'ADN par la PolIII: l'occupation de TFIIC sur un gène de classe III augmente en absence d'activité transcriptionnelle (Roberts et al., 2003). Cependant, 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 la PolIII sur les gènes de classe III indique que TFIIB et la PolIII 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 and Kassavetis, 2008).

Durant la phase initiale d'élongation de la chaîne d'ARN, la PolIII produit sans succès des petits transcrits (Bhargava and Kassavetis, 1999). Après l'incorporation avec succès de quelques ribonucléotides, la PolIII s'enlève du promoteur et coupe sa connection avec TFIIB (Kassavetis et al., 1992a). La petite longueur des gènes transcrits par la PolIII conduit à une proximité des sites d'initiation et de terminaisons. La remarquable stabilité des complexes TFIIB-ADN, même en absence de TFIIC sert à une réinitiation facilitée de la transcription (Dieci and Sentenac, 1996; 2003; Ferrari et al., 2004).

La chaîne d'élongation d'ARN se passe inégalement, et la PolIII semble avoir besoin de beaucoup de temps particulièrement quand trois résidus UMP (Uridine Monophosphate) doivent être ajoutés (Matsuzaki et al., 1994). Une telle pause paraît être cruciale pour la terminaison, elle-même accompagnée de la genèse de petits oligonucléotides par un clivage hydrolytique à l'extrémité 3' de l'ARN (Bobkova and Hall, 1997). En contraste avec les autres ARN polymérase, la PolIII est capable de reconnaître un signal de terminaison, pourvu par un simple ajout de résidus T, d'une manière indépendante des facteurs de terminaison (Geiduschek and Kassavetis, 2001; Dieci et al., 2007). Des études récentes montrent le rôle critique des sous-unités C53, C37 et C11 de la PolIII pour la terminaison et la réinitiation de la transcription (Landrieux et al., 2006).

2.2.2.4.3. Terminaison

La PolIII est capable d'effectuer seule la terminaison de la transcription. La PolIII 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 la PolIII est influencée par la région qui entoure (Braglia et al., 2005). La reconnaissance du signal de terminaison et le clivage de l'ARN sont deux activités distinctes pouvant être découplées (Campbell and Setzer, 1992). Au cours de l'étape de terminaison, la PolIII assure également l'activité de clivage de l'ARN naissant. Ainsi, le signal de terminaison oblige l'ARN Pol III à faire une pause, ce qui aboutit à sa dissociation de la matrice ADN (Bobkova and Hall, 1997), puis la Pol clive le transcrit.

La sous-unité C11 de la PolIII semble être impliquée dans ce clivage (Chédin et al., 1998; Landrieux et al., 2006).

2.2.2.4.4. Réinitiation

La réinitiation facilitée de la transcription est un autre phénomène qui accompagne la terminaison de la transcription par la PolIII. Effectivement, passé le premier cycle de transcription, la PolIII 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 and 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). Par ailleurs, il a été observé que sur des petites unités transcrites, la PolIII 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 la PolIII, après la libération du transcrit néosynthétisé. D'autre part, les deux facteurs TFIIB et TFIIC sont impliqués dans cette réinitiation facilitée. A la fin d'un cycle de transcription, TFIIB reste associé au promoteur et facilite la recapture de la PolIII aux séquences promotrices des petits gènes de classe III, permettant ainsi le démarrage rapide d'un autre cycle. La présence de TFIIC stimule fortement le taux de réinitiation sur des gènes longs comme *src1*, probablement par compaction de l'unité de transcription via des courbures de l'ADN. Cependant, lorsque ces expériences sont réalisées en présence de TFIIB 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 and Dieci, 2008).

2.2.3. Régulation de l'activité de la machinerie de transcription de l'ARN Polymérase III

La machinerie de transcription de la PolIII est hautement régulée avec la prolifération et la croissance cellulaire. En effet, dans des cellules en division et en croissance actives, l'activité PolIII est importante contrairement à des cellules au repos où l'activité PolIII est grandement limitée par la diminution du remplacement des produits PolIII au cours du temps.

La transcription PolIII est également rapidement inhibée après certains stress cellulaires comme les cassures au sein de l'ADN, et la privation en sérum. L'intérêt pour la compréhension de la régulation de la transcription par la PolIII est grandissant, son rôle dans la division cellulaire, et sa coordination avec la transcription par les PolII et PolIII de certains gènes impliqués, par exemple, dans la biogenèse du ribosome. La transcription PolIII est régulée par au moins deux mécanismes généraux, le premier agissant à travers les séquences promotrices, et le second à travers la machinerie de transcription basale (Howe and Shu, 1989).

La régulation de la transcription à travers la machinerie de transcription basale PolIII

On a constaté qu'un bon nombre de facteurs régule la transcription PolIII, incluant les protéines du Rétinoblastome (Rb), c-Myc, PNR (Prolin-rich Receptor), p53, Maf1, CK2 (Casein Kinase 2), et la liste ne cesse de s'allonger. Ces facteurs régulent aussi la transcription d'un ensemble de gènes PolIII et également les gènes ARNr de la PolII (**Figure 12**).

Il existe quelques activateurs de la transcription de la PolIII. En effet, c-Myc se lie à Brf1-TFIIIB et active les promoteurs de classe 1 et 2 (Gomez-Roman et al., 2003). De façon similaire, PNR, un récepteur nucléaire co-activateur, qui régule un bon nombre de gènes transcrits par la PolII, s'associe avec la sous-unité RPC30 de la PolIII, et active la transcription de la PolIII dans les cellules MCF7, lignée cellulaire issue du cancer du sein (Zhou et al., 2007).

Nous avons de plus amples informations sur les répresseurs de la PolIII. Les promoteurs PolIII de type 2 sont réprimés par Rb, aussi bien par p107 que p130, qui se lient à la sous-unité Brf1-TFIIIB et empêchent l'association Brf1-TFIIIB avec les promoteurs (Larminie et al., 1997; Sutcliffe et al., 1999). La transcription du promoteur du type 3 U6 est aussi inhibée par Rb, qui dans ce cas, s'associe avec SNAPc (Hirsch et al., 2000; 2004). Les promoteurs de type 2 de la PolIII sont également régulés avec le cycle cellulaire, à travers la voie impliquant la protéine kinase ERK (Extracellular Regulated MAP Kinase), qui lie et phosphoryle Brf1 (Felton-Edkins et al., 2003). La transcription PolIII est basse dans la phase G1 et haute dans les phases S et G2 (White et al., 1995; Scott et al., 2001). Durant la mitose, la transcription PolIII est réprimée par la kinase cdc2/cycline B soit par l'intermédiaire d'une phosphorylation directe de Brf1-TFIIIB ou par l'activation de kinases secondaires, qui phosphorylent à leur tour Brf1-TFIIIB (Gottesfeld et al., 1994; Leresche et al., 1996). Par exemple, cette kinase secondaire peut être CK2, elle inactive Bdp1 par phosphorylation

directe (Hu et al., 2004). Cependant, CK2 peut aussi activer la transcription à travers la phosphorylation de la PolIII elle-même, ou un facteur associé à la PolIII (Hu et al., 2003). Par conséquent, CK2 possède, à la fois des rôles positifs et négatifs dans la transcription de la PolIII.

La protéine p53 réprime la transcription de la PolIII. Sur les promoteurs de type 1 et 2, p53 inhibe l'occupation du promoteur PolIII en ciblant la sous-unité TBP ou Brf1-TFIIB (Cairns and White, 1998; Crighton et al., 2003). Par exemple, après le traitement de cellules avec un agent de lésions de l'ADN, le méthane méthylsulfonate, la transcription des ARNt est inhibée, au moins en partie en conséquence des effets dirigés par p53; l'association de TFIIB avec TFIIC2 et la PolIII en solution est réduite, comme l'association de TFIIB avec les promoteurs ARNt *in vivo* (Crighton et al., 2003). Sur les promoteurs de type 3, p53 inhibe la transcription PolIII par association avec le promoteur lui-même (Gridasova and Henry, 2005).

Maf1 est également un répresseur de la transcription de la PolIII (Pluta et al., 2001). En effet, Maf1 chez la levure est un composant commun essentiel à trois voies de signalisation réprimant la transcription de la PolIII, c'est à dire la voie de signalisation ayant un défaut sécrétoire, la voie de signalisation de la rapamycine (TOR), la voie de signalisation de lésion à l'ADN (Upadhyya and Lee, 2002; WILLIS and Desai, 2004). Dans les cellules où Maf1 est délété, il n'y a plus de répression de la transcription en réponse à ces voies de signalisation. Un travail récent (Oficjalska-Pham et al., 2006) nous a significativement fait avancer dans notre compréhension de la répression par Maf1 de la transcription de la PolIII chez la levure (Geiduschek and Kassavetis, 2006). Dans les cellules en croissance, Maf1 est présent à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. Une grande fraction de Maf1 est phosphorylée, au moins en partie par la PKA (cAMP-dependent Protein Kinase), pour lutter contre la répression par Maf1 (Moir et al., 2006). En exposant des cellules à une variété de stress, Maf1 est déphosphorylée de manière dépendante à PP2A, se déplace au niveau du noyau, et occupe les promoteurs PolIII (Oficjalska-Pham et al., 2006). La forme déphosphorylée de Maf1 peut s'associer avec la PolIII et *in vitro*, Maf1 est capable d'empêcher l'assemblage du complexe de transcription avec Brf1, ce qui suggère qu'en plus de l'inhibition de la transcription à travers la liaison à la PolIII, Maf1 peut aussi empêcher l'assemblage de nouveaux complexes de transcription (Desai et al., 2005). Maf1 est conservé dans les autres espèces (Pluta et al., 2001), augmentant la possibilité que Maf1 pourrait être impliqué dans la répression de la PolIII dans les cellules de mammifères. En effet, des résultats montrent que Maf1 est un répresseur de la transcription de la PolIII à la fois *in vitro* et *in vivo* (Reina et al., 2006), régulant de façon négative la transcription des promoteurs de la

PolIII de type 1, 2, et 3. Maf1 humaine est nécessaire pour une régulation négative de la transcription de la PolIII, et s'associe avec Brf1 aussi bien qu'avec les sous-unités PolIII RPC1 et RPAC2. Comme chez la levure, la protéine humaine Maf1 est phosphorylée et devient largement déphosphorylée après stress. C'est cette forme déphosphorylée de Maf1 qui s'associe avec la PolIII (Reina et al., 2006). Par conséquent, Maf1 est potentiellement le centre régulateur de la transcription de la PolIII chez les cellules de mammifères (**Figure 12**).

L'activation de la transcription à travers les séquences promotrices régulatrices

Le meilleur exemple de la régulation par les séquences régulatrices promotrices est celle du promoteur de type 3 humain de l'ARNsnU6. Les promoteurs de type 3 contiennent un élément de séquence distal qui peut être composé de protéines variées, une d'entre elles est presque toujours une séquence octamère qui recrute le domaine POU du facteur de transcription Oct-1, et l'autre un élément SPH (Sph1 Postoctamer Homology) qui recrute la protéine STAF en doigt de zinc (ZNF143).

Dans le cas d'Oct-1, nous savons que les domaines d'activation de la protéine et le domaine de liaison à l'ADN contribuent à l'activation de la transcription. Le mécanisme par lequel le domaine d'activation d'Oct1 se déroule n'est pas encore connu. Néanmoins, le domaine de liaison à l'ADN d'Oct-1, le domaine POU, aide au recrutement du complexe de transcription basal SNAPc en se liant de manière coordonnée avec SNAPc sur le promoteur U6. Le domaine POU est un domaine de liaison à l'ADN bipartite: un domaine amino-terminal POU-spécifique (POUS) et un domaine carboxy-terminal POU-homéo (POUH), joint par un espace flexible (Herr and Cleary, 1995). La liaison coordonnée entre le domaine POUS d'Oct-1 et la plus grande sous-unité de SNAPc est, en effet, menée par un nucléosome positionné entre PSE et DSE dans le promoteur U6 (Ford et al., 1998; Zhao et al., 2001). Oct-1 n'est pas capable de lier la chromatine pré-assemblée *in vitro*, suggérant que l'activation de la transcription du gène ARNsnU6 *in vivo* requiert la liaison d'un autre facteur qui peut, ensuite, soit recruter Oct-1 directement, soit modifier la chromatine pour se rendre accessible à Oct-1.

L'élément de séquence distal peut être également Staf (ZNF143). En effet, STAF n'active pas seulement la transcription U6 à partir d'un modèle *in vitro* comme Oct-1, il est en plus capable de se lier à la chromatine pré-assemblée (Yuan et al., 2007). De plus, Staf s'associe avec beaucoup de facteurs qui, sont impliqués ou probablement impliqués dans la modification de la chromatine. Un de ceux-ci, CHD8 (Chromodomain-Helicase-DNA binding

protein 8), réside sur les promoteurs humains U6, ainsi que sur beaucoup de promoteurs de la PolIII *in vivo*, contribuant à une transcription U6 efficace.

Ces exemples suggèrent que la transcription de la PolIII utilise certainement beaucoup de facteurs utilisés pour le remodelage de la chromatine sur les promoteurs PolII.

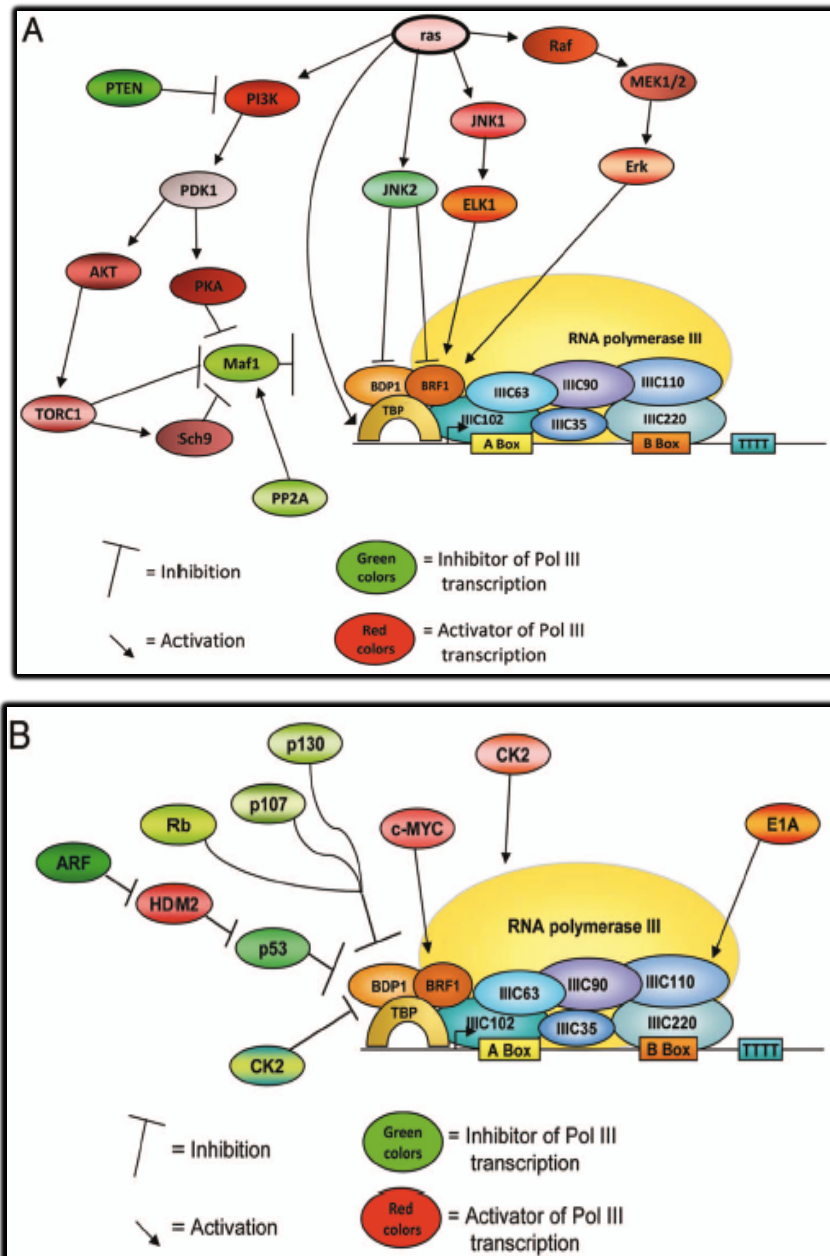


Figure 12. (A) Représentation schématique de quelques voies de signalisation régulatrices de la transcription initiée par l'ARN polymérase III: les voies de signalisation dépendantes de Ras. (B) Représentation de quelques voies de signalisation régulatrices de la transcription initiée par l'ARN polymérase III: La régulation de la transcription PolIII par les protéines suppresseurs de tumeurs et les protéines oncogènes.

2.3. Nucléosome et transcription

2.3.1. Modification des nucléosomes

L'extrême diversité des modifications post-traductionnelles ainsi que leur implication dans des processus biologiques spécifiques ont poussé les scientifiques à imaginer un "code histone" (Jenuwein and Allis, 2001). Ces modifications sont déposées par un large panel d'enzymes de modification des histones et sont reconnues par diverses protéines non histones. Ces dernières peuvent alors traduire l'information épigénétique portée par les histones en processus biologiques. Ainsi, le code histone a la capacité de compléter l'information contenue dans le code génétique et de l'étendre considérablement. Selon l'hypothèse du "code histone", des marques, uniques ou combinées sur les histones, apportent une information pour le statut de l'expression génique à travers la mitose et les générations cellulaires descendantes (Jenuwein and Allis, 2001). Ainsi, les histones font l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles se localisant au niveau de l'extrémité N-terminale des histones "Cœur", qui est riche en acides aminés basiques. Ces modifications épigénétiques ont pour conséquence de moduler l'accessibilité de l'ADN à des facteurs régulateurs et sont corrélées avec le statut transcriptionnel d'un gène (Agalioti et al., 2000; Syntichaki et al., 2000; Nakayama et al., 2001). Par exemple, l'acétylation est associée avec la transcription, et la phosphorylation est associée à la condensation des chromosomes ou à la réparation de l'ADN (Peterson and Côté, 2004; Thiriet and Hayes, 2005). De façon intéressante, les modèles différentiels des modifications sur la lysine 9 (K9), la sérine 10 (S10) et la lysine 14 (K14) de l'histone H3 apparaissent être liés avec une activité génique locale (**Figure 13**). Un état inactif de la chromatine est souvent caractérisé par une déacétylation de la lysine 14 (K14), qui ensuite permet la méthylation de la lysine 9 (K9) (Noma et al., 2001) (**Figure 13**). Cependant, une acétylation de K14 est précédée par, et dépend de, la phosphorylation de la Sérine 10. Ces modifications post-traductionnelles des histones peuvent servir de cibles pour la fixation des complexes de remodelage (**Figure 13**). Les variants d'histones sont capables de réguler la fixation de ces mêmes complexes. Par conséquent, ces trois voies sont inter-dépendantes, mais aussi réversibles. La réversibilité de ces modifications met en évidence la plasticité de l'information épigénétique, à l'inverse du code génétique, qui est relativement stable.

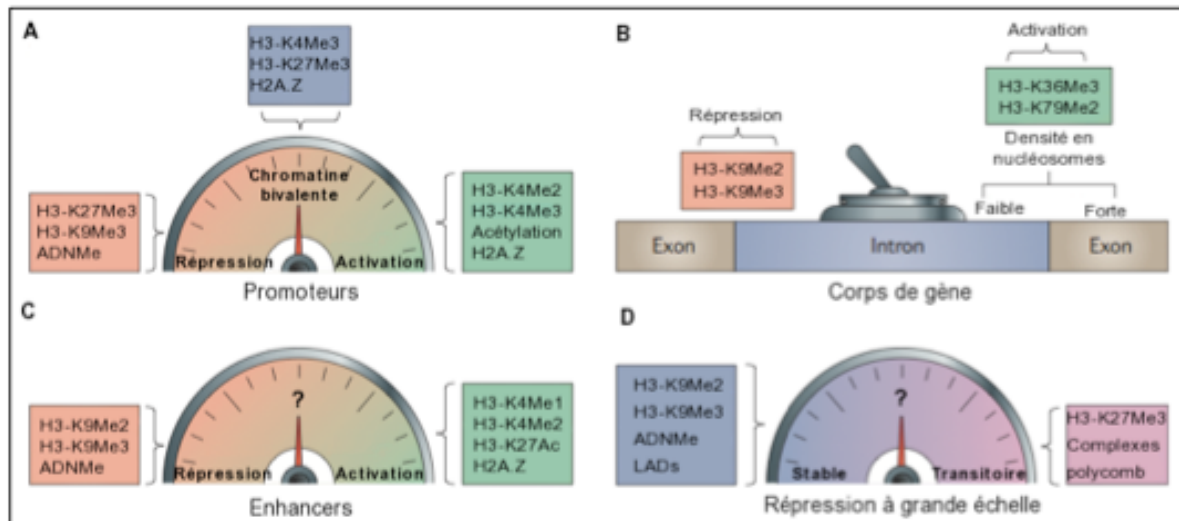


Figure 13. Modifications post-traductionnelles d'histones et régulation transcriptionnelle. A. Dans les promoteurs, les modifications post-traductionnelles et les variants d'histones contribuent à la régulation transcriptionnelle allant de transcription active à transcription réprimée en passant par un état intermédiaire appelé chromatine bivalente. B. Dans les corps de gènes, certaines modifications post-traductionnelles favorisent ou répriment la transcription. La densité en nucléosomes est aussi importante. C. Dans les enhancers (régions plus éloignées du gène), les modifications post-traductionnelles et les variants d'histones peuvent aussi impacter la transcription. D. A plus grande échelle, les modifications post-traductionnelles d'histones, la méthylation de l'ADN et des complexes d'interaction à la chromatine peuvent moduler la formation d'hétérochromatine pour réprimer la transcription de façon transitoire ou stable. ADNMe: méthylation de l'ADN; LADs (Lamina-Associated Domains) (D'après Zhou et al., 2011).

2.3.2. Remodelage de la chromatine

2.3.2.1. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est la modification chimique la mieux caractérisée de la chromatine, chez les eucaryotes. Le processus de méthylation de l'ADN implique le transfert d'un groupement méthyl provenant de la S-adenosyl methionine (SAM) sur la position C-5 d'une cytosine modifiant celle-ci en 5-méthyl cytosine (5meC), par l'action d'une ADN méthyltransférase (DNMTs). Cette modification est à la fois mitotiquement et méiotiquement non-héritable, et est impliqué à long terme dans la condensation de la chromatine. Chez les mammifères, la quasi-totalité de la méthylation de l'ADN se produit dans le cadre de dinucléotides CpG, tandis que dans les plantes, la cytosine peut être méthylée sur les sites CpG, CpNpG, et CpNpN, où N désigne tout autre nucléotide que la Guanine. La méthylation

joue un rôle crucial dans la régulation des gènes et dans l'organisation de la chromatine lors de l'embryogenèse et de la gamétogenèse (Goll and Bestor, 2005). La méthylation de l'ADN sur les cytosines joue un rôle important dans beaucoup de processus cellulaires incluant le "silencing" des transposons et des séquences centromériques des champignons jusqu'aux mammifères; l'inactivation du chromosome X chez les mammifères de sexe féminin, et l'empreinte génomique des mammifères, qui peuvent tous être maintenus de manière stable.

2.3.2.2. Les ARNs non-codants

Récemment il est devenu évident que les ARNs, particulièrement les ARNs non-codants, jouent un rôle important dans une variété de phénomènes épigénétiques (Bernstein, 2005). Les ARNs non-codants comme les ARNr, les ARNt, les ARNsn, les ARNsno et les petits ARNs interférents (siRNA) peuvent servir de fonctions catalytiques et d'échaffaudage dans la transcription, la maturation des ARNm, la traduction, et la dégradation des ARNs. Les ARNs non-codants agissent souvent de concert avec diverses composantes de la chromatine de la cellule et la machinerie de méthylation de l'ADN pour obtenir un "silencing" stable.

2.3.2.3. Les variantes d'histones

Chaque histone, à l'exception de l'histone H4, existe sous plusieurs formes protéiques dans la cellule. Ces différentes protéines, appelées "variantes d'histones" sont codées par des gènes différents. L'incorporation de variantes d'histones au sein du nucléosome introduit un degré supplémentaire de complexité à la structure de la chromatine puisqu'on constate une modification des interactions entre l'ADN et les protéines. Ainsi, ce processus a pour conséquence de moduler l'accessibilité de l'ADN pour des facteurs de transcription. Il s'agit donc de modifications épigénétiques. De plus, ces variantes d'histones sont également la cible de modifications post-traductionnelles ajoutant encore un niveau de complexité au "code histone". Contrairement aux histones "classiques", l'incorporation des variantes d'histones au sein du nucléosome peut avoir lieu en dehors de la phase de réplication de l'ADN. De plus, la localisation et l'expression des variantes d'histones sont finalement régulées selon le stade de développement ou le tissu considéré, suggérant qu'ils puissent avoir des fonctions précises, particulièrement importantes. A l'appui de cette hypothèse, de nombreuses pathologies

humaines, telles que l'infertilité ou le cancer, sont associées à la perte de fonction de certains variants d'histones (Boulard et al., 2007).

Il existe quatre variantes d'histones pour H2A (H2AZ, H2AX, MacroH2A, Bbd) auxquels on peut ajouter les variantes qui sont exprimées uniquement dans le testicule (TH2A, H2AL1 et H2AL2) (**Figure 14**).

H2AZ est une variante particulièrement conservée au cours de l'évolution, même au regard d'H2A. Il exerce à la fois une activité positive et négative sur l'expression des gènes. Pour exemple, chez la levure, H2AZ est associée aux sites d'initiation de la transcription des gènes inactifs. L'éviction de cette variante d'histone serait un processus rapide permettant l'activation des gènes (Guillemette et al., 2005).

H2AX est une variante d'histone qui est phosphorylée sur la Sérine 139 en réponse à des cassures double-brin de l'ADN (Rogakou et al., 1998). Cette phosphorylation est présente au niveau de ces cassures et participe à la réparation de l'ADN, en collaborant avec la machinerie de réparation (Celeste et al., 2003).

MacroH2A a la particularité d'avoir une taille trois fois plus grande que celle de l'histone canonique H2A (Pehrson and Fried, 1992). Cette variante est localisée en particulier sur le chromosome X inactif (Costanzi and Pehrson, 1998), également appelé corpuscule de Barr, où elle est associée à la répression transcriptionnelle (Perche et al., 2000).

H2ABbd (H2A Barr Body Deficient) est, quant à elle, exclue du corpuscule de Barr. On la retrouve plutôt associée aux régions acétylées, suggérant qu'elle pourrait être associée à l'activation des gènes (Chadwick and Willard, 2001; Angelov et al., 2004). Enfin, certaines variantes de l'histone H2A présentent une expression restreinte au testicule TH2A (Testis specific H2A), H2AL1 et H2AL2 (H2A Like 1 et 2) (Rao et al., 1983; Govin et al., 2007).

Les variantes d'H2B, sont au nombre de 3, **TH2B** (Testis Specific H2B), **TSH2B** (Testis/Sperm specific H2B) et **H2BFWT** (H2B Family member W, Testis specific). Elles présentent une expression restreinte aux cellules de la lignée germinale mâle. Il est important de souligner, qu'au cours de la spermatogenèse, la chromatine est profondément réorganisée. En effet, les histones somatiques sont en partie remplacées par des protéines de transition puis par d'autres protéines appelées protamines. Au final, la chromatine des spermatozoïdes est

hautement compactée (Sassone-Corsi, 2002). Il n'est donc pas surprenant de découvrir des variantes d'histones dont l'expression est limitée au testicule. TH2B et TSH2B sont exprimées très précocement au cours de la spermatogenèse, dès les divisions mitotiques, et cette expression est maintenue jusque dans les spermatozoïdes matures. La régulation de l'expression de TSH2B doit être finalement contrôlée car une corrélation inverse entre la quantité de cette protéine dans le sperme et la morphologie des spermatozoïdes a été observée, suggérant que TSH2B pourrait être impliquée dans des mécanismes conduisant à l'infertilité masculine (van Roijen et al., 1998). Enfin, la variante d'histone H2BFWT, caractérisée en 2004, n'a pas encore de fonction connue (Churikov et al., 2004; Boulard et al., 2007).

Il y a des variantes d'histones pour H3, **CENH3** (Centromeric H3), H3.3 et **H3t** (H3 testis specific) (**Figure 14**). CENH3 est localisée au niveau de régions chromosomiques particulières, les centromères, où il est indispensable à la fonction de celui-ci. H3.3 est localisée dans des régions transcriptionnellement actives (Chow et al., 2005). Enfin, une région restreinte aux cellules de la lignée germinale mâle a été décrite pour la variante H3t (Witt et al., 1996).

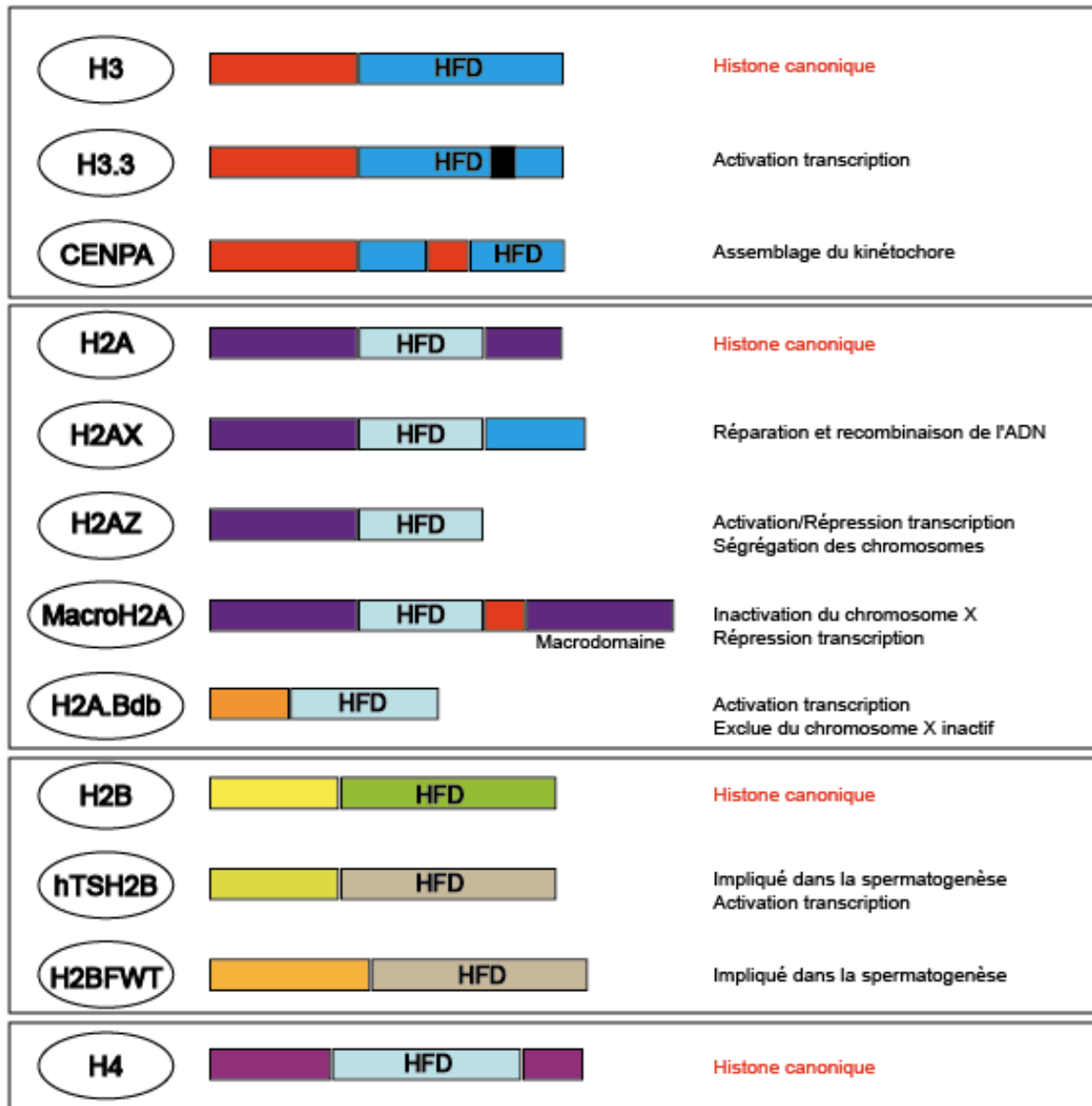


Figure 14. La diversité des variants d'histones et leurs implications fonctionnelles (HFD = Histone Fold Domain).

2.3.2.4. Les complexes ATP-dependants remodelant la chromatine

Les complexes de remodelage de la chromatine sont également capables d'agir sur la structure de la chromatine pour influencer les processus de transcription. En effet, les complexes de remodelage de la chromatine, constitués de plusieurs protéines, permettent le mouvement des nucléosomes le long de l'ADN. Ils peuvent se déplacer en cis par glissement, en trans par transfert ou même réaliser l'éviction complète du nucléosome. Ces complexes multiprotéiques comportent une sous-unité ATPasique. C'est en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP (Adénosine Triphosphate), que les complexes de remodelage altèrent les

liaisons entre les histones et l'ADN, permettant le mouvement des nucléosomes (Becker and Hörz, 2002). Ainsi, les complexes de remodelage sont capables de faciliter ou de restreindre l'accès de l'ADN à des facteurs de transcription et constituent le dernier mécanisme épigénétique agissant sur le nucléosome.

Les facteurs de remodelage sont classés en quatre familles principales en fonction de certains domaines additionnels présents au sein de l'unité contenant l'activité catalytique ATPase (**Figure 15**).

La famille SWI/SNF

Le domaine fonctionnel additionnel caractéristique de la famille SWI/SNF est un bromodomaine, capable de se lier aux histones acétylées. Les complexes SWI/SNF, à travers la lecture de ces marques épigénétiques, participent ainsi à l'activation de la transcription (Kasten et al., 2004).

La famille ISWI

La famille ISWI présente de nombreuses similarités avec la famille SWI/SNF. Cependant, la présence d'un domaine SANT (Swi3, Ada2, N-Cor, TFIIB) dans la sous-unité ATPase et l'absence d'un bromodomaine permettent de distinguer cette deuxième famille. Le domaine SANT serait un domaine de liaison aux histones non-modifiées (Boyer et al., 2004). Le complexe ISWI est impliqué dans la réplication de l'ADN. Ce complexe de remodelage se lie aux sites de réplication, grâce à son interaction avec la protéine de réplication PCNA, et participe à l'assemblage de la chromatine (Poot et al., 2005).

La famille INO80/SWR1

Cette famille ne possède pas de domaine particulier dans la sous-unité ATPase mais une séquence espaceur fractionnant le domaine ATPase en deux (shen et al., 2000). Le complexe INO80 est capable de se lier au variant d'histone γ -H2AX enrichi au niveau des cassures double-brin de l'ADN. Ainsi, ce complexe de remodelage participerait à la réparation de l'ADN en favorisant le déplacement des nucléosomes (Cairns, 2004). Le complexe SWR1, quant à lui, facilite l'échange de l'histone H2A contre son variant H2AZ (Korber and Hörz, 2004).

La famille CHD

La famille CHD se différencie des autres par la présence d'un chromodomaine au sein de la sous-unité ATPase. Ce chromodomaine permet notamment l'interaction de CHD1 avec l'histone H3 méthylée sur K14, facilitant ainsi l'ouverture de la chromatine chez *S. cerevisiae* (Sims et al., 2005). Cependant, un autre complexe appartenant à la famille CHD, le complexe NurD possède deux membres bien connus, HDAC1 (Histone Déacétylase 1) et HDAC2 (Histone Déacétylase 2). Le recrutement contribuerait donc à la répression de la transcription des gènes chez l'homme (Kantor et al., 2003).

Les facteurs de remodelage permettent de réguler l'accès à l'ADN à la machinerie de transcription. Mais ils peuvent aussi faciliter la replication de l'ADN et sa réparation. Leur régulation est donc essentielle pour assurer une activité spatio-temporelle correcte. Ainsi, au cours de la mitose, des complexes de remodelage sont inactivés et exclus de la chromatine facilitant ainsi sa compaction et inhibant par la même occasion la transcription. L'éviction du facteur de remodelage SWI/SNF est corrélée à la phosphorylation de deux de ses ATPases. Ce processus est parfaitement réversible, une fois la mitose terminée, par une simple déphosphorylation (Muchardt et al., 1996; Sif et al., 1998). Un mauvais contrôle de l'activité de ces complexes de remodelage peut se révéler désastreux. En effet, de nombreuses pathologies, comme le cancer, sont associées à une dérégulation de l'expression des complexes de remodelage (Cho and Elizondo, 2004).

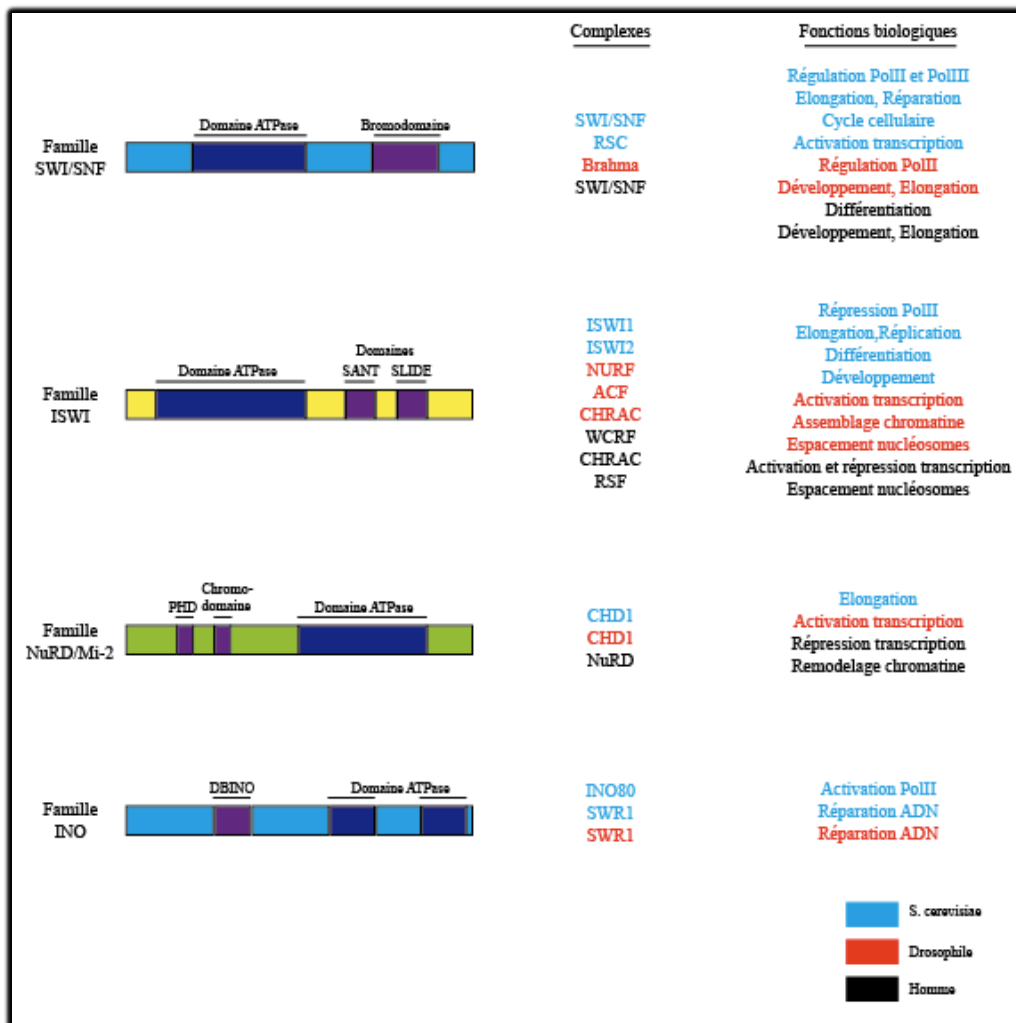


Figure 15. Les complexes ATP-dépendants remodeleurs de la chromatine et leurs implications fonctionnelles.

2.3.2.5. Modifications post-traductionnelles des histones

L'extrémité N-terminale des histones "cœur", riche en acides aminés basiques fait l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ces modifications épigénétiques ont comme conséquence de moduler l'accessibilité de l'ADN à des facteurs régulateurs et sont corrélées avec le statut transcriptionnel d'un gène. Les modifications post-traductionnelles consistent en des acétylations (sur des résidus lysines), méthylation (sur des résidus lysines et arginines), phosphorylations (sur des résidus sérines et thréonines), ubiquitinations (sur des résidus lysines) ou encore sumoylations (sur des résidus lysines). Une des implications du code des histones est que les différentes modifications servent de balises pour le recrutement d'autres complexes. La découverte de motifs tels que les bromodomaines et les

chromodomaines, qui reconnaissent respectivement les histones acétylées et méthylées conforte cette hypothèse.

Le bromodomaine est un motif protéique d'environ 110 acides aminés, conservé chez les eucaryotes. On le retrouve fréquemment dans des protéines ayant un rapport avec la régulation de l'activité transcriptionnelle et notamment dans des protéines appartenant à des complexes Histone Acétyltransférase ou de remodelage de la chromatine comme par exemple Gcn5, Sth1, ou Rsc4 (Dhalluin et al., 1999; Ornaghi et al., 1999).

Le chromodomaine est un motif constitué d'une cinquantaine de résidus. Décrit pour la première fois chez la drosophile dans les protéines Polycomb et HP1, ce module a par la suite été identifié dans toute une série de protéines différentes comme des histones méthyltransférases, des histones acétyltransférases, des intégrases, ou encore des hélicases. La fonction exacte des chromodomaines n'est pas connue mais un rôle proposé est celui de moduler, en les ciblant, certaines zones chromosomiques ou des acides nucléiques (Eissenberg, 2001).

La méthylation

Les histones "cœur" peuvent être méthylées sur plusieurs sites connus de lysine et d'arginine, principalement au niveau des queues des histones H3 et H4. La méthylation ne change pas la charge de la queue des histones mais augmente en revanche son hydrophobicité (Martin and Zhang, 2005). Les protéines, qui catalysent cette réaction, sont conservées et constituent les Histones Méthyltransférases (HMT). Elles transfèrent un groupement méthyle, à partir d'un co-facteur SAM, vers un résidu lysine ou arginine.

Les arginines peuvent être mono- ou di-méthylées, alors que les lysines ont la capacité d'être mono-, di-, ou tri-méthylées (Bannister et al., 2002). Ces différents degrés de méthylation des résidus donnent des combinaisons très complexes, permettant à cette modification d'être impliquée dans un spectre très large de processus cellulaires, c'est à dire de la régulation de l'expression des gènes jusqu'au maintien des structures chromosomiques. En effet, par exemple, H3K4Me3 peut être aussi présent dans les promoteurs des gènes exprimés et réprimés (Santos-Rosa et al., 2002; Schneider et al., 2004; Barski et al., 2007). Les méthylation de H3K9, H3K27 et H4K20 sont, quant à elle, généralement associées à la chromatine répressive. Par exemple, H3K27Me3 de concert avec les complexes de répression Polycomb est un marqueur d'hétérochromatine facultative, correspondant à des zones du génome qui contiennent des gènes silencieux, différentiellement exprimés au cours du développement et/ou de la différenciation. En revanche, H3K9Me3 est enrichi avec HP1 dans

l'hétérochromatine constitutive et correspond à des zones du génome condensées de façon permanente aux centromères et télomères (Trojer and Reinberg, 2007). H3K36Me3 a été localisé dans des gènes dont la transcription est activée et réprimée. Ainsi, cette marque peut être nécessaire à l'élongation de la transcription, ou bien à l'arrêt de l'élongation. En outre, cette marque peut aussi être retrouvée dans des régions d'hétérochromatine facultative et constitutive (Chantalat et al., 2011). De plus, il a été montré que H3K4Me3 (marque d'activation transcriptionnelle) et H3K27Me3 (marque de répression transcriptionnelle) peuvent co-exister dans une même région génomique appelée chromatine bivalente qui marque les gènes associés au développement. Ces gènes peuvent être très rapidement activés ou réprimés en fonction du stade de développement (Bernstein et al., 2006).

La phosphorylation

La phosphorylation des histones par des histones kinases consiste en une réaction du transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP vers un résidu sérine ou thréonine. Cette modification modifie la charge des histones et est à la base de la régulation de plusieurs facteurs importants dans les grands processus de la biologie cellulaire (Cheung et al., 2000).

Plusieurs résidus sérine et thréonine peuvent être phosphorylés, tels que la sérine 1 de l'histone H4, la thréonine 4 et les sérines 10 et 28 de l'histone H3, la sérine 1 de l'histone H2A, et enfin les sérines 32 et 36 de l'histone H2B (Meneghini et al., 2003). La phosphorylation a pour conséquence de déstabiliser les interactions électrostatiques entre les queues des histones chargées positivement et l'ADN fortement chargé négativement. Ceci entraîne alors une augmentation de l'accessibilité des facteurs nucléaires à l'ADN (Cheung et al., 2000) et entraîne l'activation transcriptionnelle (Yamamoto et al., 2003). La phosphorylation en mitose peut également amener à la condensation des chromosomes (Cheung et al., 2000). En effet, durant cette phase du cycle cellulaire, H3S10 est phosphorylé ce qui réduit la liaison d'HP1 à H3K9me2/3 provoquant l'enlèvement d'HP1 des chromosomes mitotiques (Fischle et al., 2005).

L'ubiquitination

Les histones peuvent être ubiquitinées par l'ajout d'une protéine globulaire de 76 acides aminés, l'ubiquitine, sur une lysine située dans leurs parties C-terminales. L'ubiquitination, dépendante de l'ATP, cible les protéines vers le protéasome, et a donc un rôle dans la régulation de la dégradation protéique (Hilt and Wolf, 1996). Une autre fonction a

été également été attribuée dans la transcription et la structuration de la chromatine. D'ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence un taux important d'histones ubiquitinées dans la chromatine transcriptionnellement active (Levinger and Varshavsky, 1982; Nickel and Allis, 1989). L'ubiquitination d'H2A semble être le premier événement survenant avant la disparition de l'interaction d'H1 avec l'ADN nucléosomal, ce qui suggère un rôle précurseur dans le désassemblage de la structure dense de la chromatine (Bochar et al., 2000; Sun and Allis, 2002). L'ubiquitination d'H2A et H2B déstabilise l'interaction du dimère H2A-H2B avec le tétramère (H3-H4)₂ (Okamoto et al., 2004). Malgré tout, le lien entre cette modification et l'activation de la transcription n'est pas absolu, puisque des études, chez la levure, ont montré que l'ubiquitination H2BK123 est nécessaire à la méthylation d'H3K4 et donc à l'extinction transcriptionnelle des télomères (Sun and Allis, 2002).

L'ADP-ribosylation

L'ADP-ribosylation consiste en un transfert d'un ou plusieurs groupements ADP-ribose de la forme oxydée de NAD⁺ (Nicotinamide Adenosine Dinucleoside) sur des accepteurs protéiques, conduisant à la formation de résidus mono-ADP-ribosylés ou poly-ADP-ribosylés linéaires ou branchés (Kolthur-Seetharam et al., 2006). Ce transfert est catalysé par des poly-(ADP-ribose) polymérase (PARP). Cette modification covalente semble être un marqueur de la chromatine non structurée et joue un rôle important dans la réparation, la réplication et la recombinaison de l'ADN (Boulikas, 1990). En effet, lors d'un dommage de l'ADN, il y a une augmentation de la quantité d'histones H2B ADP-ribosylées. La synthèse d'une longue chaîne d'ADP-ribosyl pourrait faciliter le désassemblage partiel des nucléosomes et la décondensation de la chromatine (Kraus and Lis, 2003). Par ailleurs, les histones peuvent être ADP-ribosylées pendant la phase S et peuvent être modifiées de façon maximale en phase G2 (Kidwell and Mage, 1976). Enfin, Boulikas a suggéré que les histones nouvellement synthétisées pouvaient être (oligo) ADP-ribosylées, ce qui faciliterait leur assemblage dans un complexe d'histones et leur déposition sur l'ADN au niveau de la fourche de réplication. Ce processus peut être suivi par la suppression des groupes ADP-ribose des histones grâce à l'enzyme poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) (Boulikas, 1990).

La sumoylation

Il a été démontré que les histones pouvaient être sumoylées chez l'homme et *S. cerevisiae* (Shiio and Eisenman, 2003; Nathan et al., 2006). SUMO (Small ubiquitin-related modifier) est une protéine de 100 acides aminés, d'une taille de 9 kDa présentant 18%

d'homologie avec l'ubiquitine. La sumoylation des histones semble être associée à la répression transcriptionnelle. Ainsi, la sumoylation de l'histone H4 (SUMO-H4) induit le recrutement d'histone désacetylases (HDAC) et de la protéine de l'hétérochromatine HP1- γ (Shiio and Eisenman, 2003).

L'acétylation

L'acétylation joue un rôle dans la transcription des gènes, de nombreux activateurs transcriptionnels possédant une activité Histone-Acétyl-Transférase (HAT) (Brownell and Allis, 1996), et un grand nombre de répresseurs une activité HDAC (Taunton and Collins, 1996) mais depuis peu l'acétylation est également associée à divers processus comme le « gene silencing », la réparation de l'ADN et le développement (Carrozza et al., 2003). L'acétylation entraîne la neutralisation de charges des histones, ce qui diminue l'affinité des histones nucléosomales pour l'ADN et l'affinité histone-histone entre les nucléosomes. L'acétylation de toutes les histones ou seulement de l'histone H3 provoque une ouverture dans la structure du nucléosome (Tóth et al., 2006). Les queues de H3 et H4 sont importantes pour certaines interactions intra-nucléosomales, suggérant que l'acétylation des queues de ces deux histones empêche les fibres chromatinienne d'interagir les unes avec les autres réduisant ainsi le degré d'empaquetage de la chromatine (Carrozza et al., 2003). Une étude récente a montré que l'unique acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 suffit à empêcher la formation des fibres chromatinienne de 30 nm de diamètre (Shogren-Knaak and Peterson, 2006). D'autres études ont montré que l'induction d'une hyperacétylation par l'utilisation d'inhibiteurs de désacetylases tels que le butyrate de sodium, augmente l'accessibilité de l'ADN chromatinien à la DNase I et peut augmenter l'expression d'un ADN transfecté (Gorman et al., 1983). Cette chromatine acétylée est efficacement remodelée par des facteurs de remodelage ATP-dépendants (Krajewski et al., 2001). Tous ces changements, qui affectent la structure nucléosomale et la structure chromatinienne, créent un environnement chromatinien plus ouvert et permissif à la transcription. Les gènes actifs présentent un fort niveau d'acétylation alors que celui-ci est faible chez les gènes réprimés. La localisation des acétylations dans différentes régions du gène suggère que ces modifications ont différentes fonctions. Par exemple, H3K9Ac, H3K14Ac et H4K8Ac sont présents à des taux élevés dans les régions promotrices en accord avec un rôle dans l'initiation de la transcription (Agalioti et al., 2002), alors que H4K12Ac est plutôt détecté dans les régions transcrites suggérant un rôle dans l'élongation de la transcription (Carey et al., 2006).

Les inhibiteurs des histones déacétylases (Butyrate de sodium ou Trichostatine A) ont révélé l'importance de l'acétylation lors de la régulation transcriptionnelle. Ainsi, ces drogues induisent la différenciation cellulaire, limitent la transformation cellulaire et entraînent l'arrêt des cellules en phase G1 ou G2, voire même leur apoptose (Sugita, 1992). Ces drogues ont été décrites comme pouvant également entraîner des défauts durant les stades précoces de l'embryogenèse chez les vertébrés (Almouzni et al., 1994). Le maintien de l'état acétylé des histones fournit un excellent mécanisme de propagation de l'empreinte chromosomique déterminant l'activité des gènes. En effet, lors de la ségrégation des nucléosomes pendant la réplication de l'ADN, l'acétylation des histones parentales est retrouvée sur les deux chromatides sœurs (Perry et al., 1993).

Les HATs ont deux fonctions attribuées, leur activité enzymatique acétyl-transférase, et leur capacité à former des complexes multiprotéiques en recrutant divers éléments de la machinerie transcriptionnelle. Les HATs catalysent le transfert d'un résidu acétyl à partir du cofacteur AcétylCoA sur les groupements amines des résidus Lysines des histones, ou des protéines non-histones telles que les facteurs de transcription (Gregory and Wagner, 2001). Il existe deux théories sur la manière dont les HATs active la machinerie transcriptionnelle: la théorie physico-chimique postule que l'acétylation des histones permet de neutraliser les charges positives portées par les résidus Lysines, et de diminuer les liaisons électrostatiques entre histones (charges positives) et l'ADN (charges négatives) aboutissant à une compaction de la chromatine et une meilleure accessibilité des gènes à la machinerie transcriptionnelle (Workman and Kingston, 1998). La théorie du code histone, elle, postule que les modifications covalentes des histones constituent un marqueur épigénétique d'expression des gènes permettant le recrutement de facteurs spécifiques d'activation ou de répression de la transcription (Strahl and Allis, 2000).

A l'heure actuelle, six familles de HATs ont été décrites. Ces familles ont été regroupées sur la base de leur similarité de séquences entre différentes régions homologues et entre divers motifs relatifs à ces HATs (Sternier and Berger, 2000).

La superfamille GNAT (GCN5-related Acétyltransférase) comprend notamment GCN5 et PCAF (p300/CBP associated Factor). Cette famille est caractérisé par la présence de plusieurs domaines fonctionnels, dont un domaine HAT très conservé, une région qui interagit avec les co-activateurs Ada2, et un bromodomaine qui reconnaît spécifiquement les lysines acétylées (Filetici et al., 2001). GCN5 fut la première HAT découverte chez le protozoaire

Tetrahymena (Brownell and Allis, 1996) et a été très rapidement identifiée chez l'Homme (Candau et al., 1996). PCAF fut initialement décrite comme interagissant avec les HATs CBP et p300 au niveau du site de fixation de l'oncoprotéine adénovirale E1A (Yang et al., 1996). Il est intéressant de noter que les complexes E1A-CBP/p300 et PCAF-CBP/p300 ont des effets opposés sur le cycle cellulaire (Yang et al., 1996). De même que PCAF, GCN5 est capable d'interagir avec CBP/p300, et toutes deux sont retrouvés au sein de complexes protéiques très conservés au cours de l'évolution (Sternier and Berger, 2000). Si PCAF et GCN5 sont exprimés de façon ubiquitaire, il est intéressant de noter que leurs taux d'expression respectifs diffèrent d'un tissu à l'autre (Xu et al., 1998), suggérant qu'elles pourraient avoir des fonctions propres. En effet, les membres de cette famille agissent au niveau de la transcription et de la réparation de l'ADN (Carrozza et al., 2003).

La famille des MYST, baptisée ainsi d'après le nom de ses membres fondateurs (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et TIP60), sont pour leur part caractérisés par un chromodomaine reconnaissant spécifiquement les résidus méthylés situés en position N-terminale et un domaine riche en cystéines liant le zinc. Cette famille comprend notamment les HATs Sas2 et Sas3 de *S. cerevisiae*, ainsi que TIP60 (Tat Interacting Protein, 60 kDa), MOZ retrouvés chez l'Homme. Tout comme les membres de la famille GNAT, les MYST possèdent un rôle dans la régulation de la transcription et la réparation de l'ADN, mais certaines MYST, comme Sas2 (Something About Silencing 2) ou Sas3 (Something About Silencing 3), ont en plus un rôle dans la formation des loci silencieux, mais jusqu'à présent aucun homologue de Sas2 et Sas3 n'a été mis en évidence chez les eucaryotes supérieurs. TIP60 fut la première HAT de la famille des MYST à avoir été découverte chez l'Homme, en tant que protéine interagissante avec Tat (protéine transactivatrice du virus HIV-1) (Kamine et al., 1996). Si TIP60 est associé à l'action du virus HIV-1, MOZ (Monocytic Leukemia Zinc finger protein) est, quant à elle, impliquée, avec CBP, dans la transformation oncogénique conduisant à la leucémie (Borrow et al., 1996).

La famille p300/CBP (CREB Binding Protein) ne comprend que ces deux membres, exprimés de manière ubiquitaire et impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation, et l'apoptose (Giordano and Avantaggiati, 1999; Goodman and Smolik, 2000). Les enzymes p300/CBP quant à elle, contiennent plusieurs domaines incluant trois motifs en doigt de zinc, un bromodomaine, un domaine HAT et au moins deux domaines indépendants qui interagissent avec de multiples

facteurs de transcription (Janknecht and Hunter, 1996). Bien que souvent associé, CBP et p300 semblent avoir malgré tout dans certains cas des fonctions distinctes (Kalkhoven, 2004). Elles interagissent avec de nombreux promoteurs de manière directe ou par l'intermédiaire de facteurs de transcription, tels que CREB (Cyclic AMP Responsive Element Binding protein), les récepteurs nucléaires aux hormones, ou encore, les activateurs relatifs aux oncoprotéines telles que c-Fos, c-Jun ou c-Myb. Le besoin de leur activité HAT dans l'activation transcriptionnelle a été mis en évidence *in vivo* (Korzus et al., 1998; Martinez-Balbás et al., 1998). Par ailleurs, Pelletier et ses collaborateurs ont montré le rôle de l'activité HAT de CBP au sein du complexe de l'ARN Polymérase I, soulignant la participation de CBP à l'activation de la transcription des gènes codant pour les ARNr (Pelletier et al., 2000).

La famille des coactivateurs de récepteurs nucléaires se compose, chez l'Homme, des protéines SRC1 (Steroid Receptor Coactivator 1) et SRC3 (Steroid Receptor Coactivator 3, ou ACTR). La fonction de co-activateur transcriptionnel de SRC1 a été initialement mise en évidence dans des cellules de mammifère: la protéine est capable de stimuler l'activation transcriptionnelle des complexes ligands/récepteurs tels que les récepteurs à la progestérone, aux glucocorticoides, aux oestrogènes, à la thyroïde, et aux rétinoïdes (Oñate et al., 1995). Son activité HAT fut, quant à elle, établie en 1997 (Spencer et al., 1997). SRC3 est également capable d'interagir avec des récepteurs nucléaires, de stimuler la transactivation de gènes cibles et d'acétyler les histones (Chen et al., 1997).

TAFII250 (TBP (TATA-Binding Protein)-Associated Factor II 250) est une HAT associée au complexe transcriptionnel TFIID. De même que les complexes TFIIA, TFIIB, TFIIE, et TFIIF, TFIID est nécessaire à la formation du complexe de pré-initiation de la transcription, permettant le recrutement de l'ARN Polymérase II (Burley and Roeder, 1996). En 1996, Mizzen et ses collègues ont mis en évidence l'activité HAT de TAFII250 (Mizzen et al., 1996). Cette activité HAT permettrait de faciliter la liaison des TBP sur la boîte TATA et la formation du complexe de pré-initiation (Imbalzano et al., 1994).

Les sous-unités de TFIIC: TFIIC90 et TFIIC110 possèdent aussi des activités HAT (Hsieh et al., 1999; Kundu et al., 1999). Il est intéressant de noter que dans ce cas précis, il s'agit de permettre la synthèse d'ARN de transfert (ARNt) puisque TFIIC est associé à la PolIII.

Au-delà de leur activité strictement Histone Acétyltransférase, certaines de ces protéines sont également capables d'acétyler des protéines non-histones, impliqués dans la structure de la chromatine, telles que les protéines HMG (High Mobility Group chromatin-associated proteins), ou dans la transcription des gènes comme des facteurs de transcription ou encore d'autres HATs. Ainsi, Bannister et ses collègues ont montré que HMG1 est un substrat de CBP (Bannister et al., 2000), mais la signification *in vivo* de cette acétylation n'a pas encore été établie. Par ailleurs, p300/CBP sont capables d'acétyler divers facteurs de transcription tels que p53, impliqué dans l'apoptose induites par des lésions à l'ADN, GATA-1 (Boyes et al., 1998), ELKF (Zhang and Bieker, 1998) dont le rôle est crucial dans la différenciation de certaines cellules sanguines, et TCF (Waltzer and Bienz, 1998) qui régule l'expression des gènes Wnt/Wingless chez la drosophile. De même, p53 (Liu et al., 1999), MyoD (Puri et al., 1997; Sartorelli et al., 1999), et E2F1 (Martinez-Balbás et al., 1998) sont des substrats de PCAF. Enfin, Chen et ses collègues ont montré que CBP est capable d'acétyler SRC-3 (Chen et al., 1999).

Les activités HAT sont contre-balançées par les activités Histone Déacétylases (HDACs) de manière à permettre l'équilibre harmonieux des niveaux d'acétylation dans la cellule (histones et protéines non-histones). Si les activités HATs sont globalement associées à une activation transcriptionnelle, les activités HDACs sont au contraire plutôt synonymes de répression transcriptionnelle (Forsberg and Bresnick, 2001; Wade, 2001). En effet, elles assurent le retour d'un résidu à un état non-acétylé. Les HDACs, comme les HATs, opèrent rarement seules, et sont très souvent retrouvées au sein de complexes multiprotéiques répresseurs. Le premier signal de répression est localisé sur l'ADN lui-même. Il s'agit de groupements méthyls sur des cytosines situées en 5' de guanosines (Îlots CpG). Ces îlots CpG permettent le recrutement des HDACs par l'intermédiaire de protéines liant ces groupements méthyls (Methy-CpG-binding-domain-containing-protein) ou d'enzymes de méthylation de l'ADN (ADN méthyltransférase). La formation de tels complexes constitue l'un des modes de régulation de l'activité HDAC, auquel il faut ajouter la localisation cellulaire de ces enzymes et les modifications post-traductionnelles dont elles font l'objet, telles que la phosphorylation et la sumoylation (Sengupta and Seto, 2004). L'activité enzymatique des HDACs, ainsi que leur participation à de nombreux complexes de répression en font des co-répresseurs transcriptionnels. Les HDACs sont regroupés en trois classes selon leur similarité de séquence avec leurs homologues de la levure (Martzen et al., 1999). Seule HDAC 11 n'est associée à aucune classe en particulier du fait de sa faible homologie de séquence avec les autres membres de la famille (de Ruijter et al., 2003).

La classe I comprend les HDACs 1, 2, 3 et 8, homologues de la protéine de *S. cerevisiae* RDP3 (Reduced Potassium Dependency 3) (Vidal and Gaber, 1991). Les HDACs de classe I sont exprimées pratiquement de manière ubiquitaire et ont une localisation majoritairement nucléaire. Seule HDAC 3 possède en plus d'un signal de localisation nucléaire (NLS) un signal d'export nucléaire (NES), suggérant qu'elle pourrait être présente dans le cytoplasme. Cependant, jusqu'à présent, aucune étude n'a mis en évidence la présence de HDAC3 dans le cytoplasme, ce qui pourrait s'expliquer par son recrutement par HDAC 4, 5 et 7 lorsque celles-ci sont liées à l'ADN au sein de complexes de répression (Fischle et al., 2002). HDAC 1 et 2 ne présentent d'activité enzymatique qu'au sein de complexes tels que Sin3, NuRD (Nucleosome Remodelling and Deacetylating) et Co-REST, qui outre ces deux HDACs, comprennent également les protéines RbAp48 et RbAp46 (Rb associated proteins 48 et 46) (Nicolas et al., 2000). Ces complexes sont très souvent associés à des co-répresseurs de la transcription NCoR (Nuclear corepressor receptor) et SMRT (Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor). HDAC 1 et 2 peuvent également lier directement des protéines de liaison à l'ADN telles que YY1 (Yao et al., 2001) ou la protéine du rétinoblastome Rb. Les HDACs 1 et 2 présentent en outre la particularité de voir leur activité et leur recrutement au sein des complexes SMRT et N-CoR et permet également l'interaction Rb-RbAp48 de même que la répression induite par l'association Rb-E2F1 (Panteleeva et al., 2004). HDAC 8 est relativement peu décrite et semble être très peu exprimée dans l'organisme (Buggy et al., 2000; Galasinski et al., 2002).

La classe II est composée des homologues de la protéine de levure HDA1 (Histone Déacétylase 1): les HDACs 4, 5, 6, 7, 9 et 10. L'expression de ces enzymes est plus restreinte que celle des membres de la classe I, suggérant des rôles plus spécifiques dans les phénomènes de différenciation et de développement (Buggy et al., 2000; Galasinski et al., 2002). Par ailleurs, ces protéines peuvent avoir, dans certains cas, une localisation cytoplasmique et non strictement nucléaire. HDAC 4 et 5, notamment, semblent capables de naviguer entre cytoplasme et noyau au cours des processus de prolifération et de différenciation musculaires d'une part (Miska, 1999) et en réponse à l'activité synaptique des neurones d'autre part (Chawla et al., 2003). HDAC 4, 5 et 7 sont capables de réprimer l'activité du facteur de transcription MEF-2, bloquant ainsi la différenciation musculaire. Ce blocage peut être levé par la phosphorylation des HDACs par l'activité CamK. La localisation cellulaire de ces trois HDACs diffère au cours de la différenciation musculaire, suggérant un mécanisme particulier de régulation de l'expression des gènes durant

ce processus. HDAC9 est également capable d'interagir avec MEF-2 (Myocyte Enhancer Factor-2), et dans le muscle adulte, permettrait le maintien d'un programme génétique de myotube différencié en réponse à la stimulation électrique exercée par les motoneurones (Méjat et al., 2005). HDAC 6 est majoritairement présente dans le cytoplasme, où elle contrôle la mobilité cellulaire dépendante des microtubules (Hubbert et al., 2002). Le membre le plus récemment découvert de la classe II est HDAC 10 (Fischer et al., 2002). HDAC 10 présente deux domaines de liaison potentielle suggérant un rôle de cette enzyme dans la régulation du cycle cellulaire, et est capable d'association avec HDAC 1, 2, 3, 4, 5 et 7 (de Ruijter et al., 2003).

HDAC 11, l'isoforme la plus récemment clonée (Gao et al., 2002), partage des régions communes aux classes I et II ce qui empêche son regroupement stricte à l'une de ces deux classes. Sa localisation est uniquement nucléaire, et son expression est restreinte à certains tissus (reins, cœur, cerveau, muscle squelettique et testicule). Cette HDAC n'a pour le moment pas été associée aux complexes de répression connus, ce qui laisse penser qu'elle pourrait posséder des fonctions particulières, distinctes des autres HDACs.

La classe III, regroupe les homologues de la protéine de levure Sir2 (Silent Informator Regulator 2), a la particularité d'avoir besoin d'un co-facteur, le NAD⁺ et d'être insensible à la trichostatine A, un des plus puissants inhibiteurs réversibles des classes I et II des HDACs. (Nous détaillerons cette famille d'HDAC dans la suite du manuscrit)

La régulation de l'acétylation et de la déacétylation apparait donc comme un phénomène hautement contrôlé, en raison du grand nombre de HATs et HDACs mises en jeu, de leur appartenance à divers complexes protéiques, au sein desquels peuvent se trouver plusieurs HATs ou HDACs, des régulations post-traductionnelles dont elles font l'objet et qui contrôlent leur activités, ainsi que de la quantité grandissante de substrats non-histones jouant un rôle particulier dans la transcription.

2.4. La famille des Sirtuines

2.4.1. Les sirtuines chez la levure

Les sirtuines doivent leur nom aux protéines Sir (Silent Information Regulator), comprenant 4 Sir (Sir1-4) (Landry et al., 2000), identifiées chez la levure comme des répresseurs de l'activité transcriptionnelle et anciennement nommées Mar (Mating-type Regulator). *Sir2*, l'homologue le plus proche des sirtuines de mammifères (Frye, 2000), est une HDAC dépendante du NAD (Imai et al., 2000; Landry et al., 2000) qui contrôle la durée de vie dans de nombreux organismes, tels que la levure, le ver et la drosophile. Chez la levure, une délétion du gène *ysir2* réduit de 50% la durée de vie répliquative alors qu'une surexpression de *ysir2* l'augmente de 30% (Kaeberlein et al., 1999). Il en est de même chez le ver et la drosophile, chez qui une augmentation de l'expression du gène *sir2.1.*, homologue de *ysir2*, allonge la durée de vie (Tissenbaum and Guarente, 2001; Rogina and Helfand, 2004), et chez la drosophile chez qui l'augmentation de l'expression de *dsir2*, homologue de *ysir2*, prolonge cette même donnée. Le fait que *sir2* semble étroitement lié à la régulation du temps de vie, de la même façon qu'une restriction calorique (Heilbronn and Ravussin, 2003), suggère que le contrôle du vieillissement par *Sir2* est associé à l'état métabolique. En effet, chez la levure, l'activation de *ysir2* par le NAD est nécessaire à l'augmentation du temps de vie induite par restriction calorique (Lin et al., 2000). De même, chez la drosophile, *dSir2* est nécessaire à l'augmentation de la longévité induite par restriction calorique (Rogina and Helfand, 2004).

2.4.2. Les sirtuines chez les mammifères

La famille des sirtuines, chez les mammifères, constitue une classe particulière de déacétylases de protéines histones ou de protéines non-histones, également appelée Histone Déacétylase de Classe III, qui sont fonctionnellement dépendantes de la présence de NAD comme co-facteur. Il existe sept orthologues, chez les mammifères, à Sir2 7, Sirt1-7 (Frye, 1999; 2000; Landrieux et al., 2006; Schwer, 2008), partageant un domaine déacétylase central conservé mais ont différentes extrémités N- et C-terminales (**Figure 16**). Ces sept sirtuines peuvent être divisée en quatre sous-classes, basée sur l'analyse phylogénétique de leur

domaine déacétylase conservé. SIRT (silent mating type information regulation 2 homolog) 1, 2 et 3 appartiennent à la classe I des sirtuines, puisqu'elles montrent la plus grande homologie à Sir2. SIRT4 appartient à la classe II, SIRT5 à la classe III et SIRT6 et 7 à la classe IV (Schwer, 2008). Il est important de noter que quelques sirtuines, chez les mammifères, ont une activité ADP-ribosylase, et que toutes les sirtuines n'ont pas la même localisation cellulaire, suggérant différentes fonctions biologiques (Michan and Sinclair, 2007). Nous détaillerons plus en détail SIRT1 dans la suite du manuscrit.

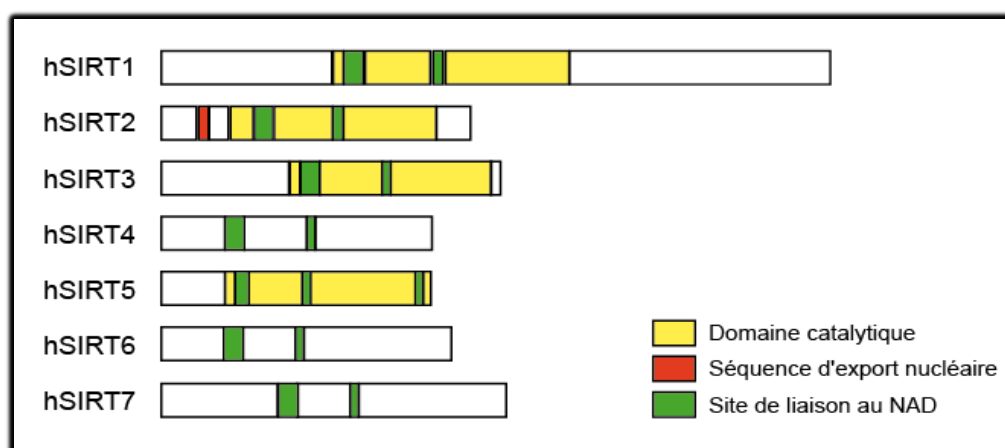


Figure 16. Schéma des domaines structuraux des sirtuines chez les mammifères.

2.4.2.1. Fonctions des sirtuines chez les mammifères

SIRT2, chez la souris et l'Homme, peut être synthétisé sous deux différentes formes résultant d'un épissage alternatif. Chez les mammifères, SIRT2 est exprimé de manière ubiquitaire, avec les plus hauts niveaux d'expression dans le cerveau, le muscle squelettique, et le cœur (Nahhas et al., 2007). SIRT2 a initialement été localisé, de façon prédominante, dans le cytoplasme (Afshar and Murnane, 1999; Perrod, 2001; North et al., 2003), mais aussi à un moindre degré, dans le noyau (North et al., 2003). SIRT2 est sous la dépendance du transport nucléo-cytoplasmique, ce qui est probablement à la base d'un mécanisme régulateur, expliquant ainsi la diversité de ses cibles cellulaires. En effet, SIRT2 est important dans la progression du cycle cellulaire, par son activité de déacétylation de l' α -tubuline (North et al., 2003) suggérant de son impact dans le transport intracellulaire, la mobilité des cellules, ou la division cellulaire. Il a également été observé que SIRT2 se relocalise dans le noyau sur la chromatine durant la phase G2/M où elle cible la lysine 16 de

l'histone H4 en la déacétylant (Vaquero et al., 2006). La fonction de SIRT2 va au-delà de la régulation du cycle cellulaire comme en témoigne son expression dans les cellules post-mitotiques. En effet, l'expression de SIRT2 a été caractérisée dans les oligodendrocytes et les fibres de myéline (Southwood et al., 2007), suggérant un rôle potentiel dans le processus de croissance et d'expansion des neurones. SIRT2 exerce également un effet inhibiteur sur la différenciation des adipocytes en régulant l'acétylation de FoxO1 (Forkhead Transcription Factor of Class O 1) (Jing et al., 2007) et enfin sur l'activité transcriptionnelle de p53 en régulant également son niveau d'acétylation (Jin et al., 2008) (**Figure 17**).

SIRT3 est une déacétylase NAD-dépendante qui est ubiquitairement exprimée, particulièrement dans les tissus métaboliquement actifs comme le muscle, le foie, les reins, et le cœur (Onyango et al., 2002). Il existe deux formes de la protéine SIRT3, la forme la plus grande possède une séquence N-terminale localisé dans le noyau (Scher et al., 2007) et attachée à la membrane interne de la mitochondrie (Schwer et al., 2002) alors que la petite forme est principalement localisée dans la matrice mitochondriale (Schwer et al., 2002). De plus, la séquence N-terminale est primordiale pour son import mitochondrial (Onyango et al., 2002; Schwer et al., 2002). Beaucoup d'auteurs considèrent que SIRT3 est synthétisé comme une protéine inactive enzymatiquement, qui est rendue active après la maturation protéolytique à l'intérieur de la mitochondrie (Schwer et al., 2002), alors que d'autres auteurs ont identifié une activité déacétylase NAD-dépendante pour la protéine entière (Scher et al., 2007), ouvrant ainsi les portes d'une activité potentielle de SIRT3 dans le noyau. La cible de SIRT3 chez l'Homme et la souris, clairement identifiée *in vitro*, est AceCS2 (Acétyl-CoA Synthetase 2), qui est activé sous la déacétylation et permet ainsi la conversion de l'acétate en Acétyl-CoA, un intermédiaire pour le cycle de l'acide tricarboxylique, la biosynthèse du cholestérol et des acides gras, et la fonction acétyl-transférerase (Schwer et al., 2006) (**Figure 17**).

SIRT4, chez l'Homme, est exprimé de manière ubiquitaire (Frye, 1999). Chez la Souris, SIRT4 est aussi exprimé dans beaucoup de tissus avec de hauts niveaux d'expression dans les reins, le cerveau, le cœur, et le foie et avec un signal très intense dans les îlots pancréatiques (Haigis and Guarente, 2006). Au niveau cellulaire, SIRT4 est localisé dans les mitochondries des cellules humaines et murines (Haigis and Guarente, 2006; Ahuja et al., 2007). A l'inverse de SIRT1, 2, et 3, SIRT4 n'a pas d'activité déacétylase NAD-dépendante, mais une activité d'ADP-ribosylation NAD-dépendante. Une des cibles de SIRT4 est la

Glutamate Déshydrogénase mitochondriale, une enzyme qui convertit le glutamate en α -kétoglutarate, un intermédiaire du cycle de l'acide tricarboxylique. En ADP-ribosylant la Glutamate Déshydrogénase, SIRT4 réprime son activité enzymatique, à la fois *in vitro* et *in vivo*, et limite la production d'ATP. Ceci a, pour conséquence, de diminuer la capacité des cellules β à sécréter de l'insuline (Haigis et al., 2006). L'identification de deux cibles cellulaires supplémentaires pour SIRT4, l'enzyme dégradant l'insuline et la translocase ATP/ADP, renforce la possibilité du rôle de SIRT4 dans le contrôle de la sécrétion de l'insuline dans les cellules β pancréatiques (Ahuja et al., 2007). SIRT4 a un effet opposé sur la sécrétion de l'insuline comparé à SIRT1, qui régule positivement la sécrétion de l'insuline via la répression de l'expression d'UCP2 (Uncoupling Protein 2) dans les cellules β pancréatiques (**Figure 17**).

SIRT5 est exprimé ubiquitairement dans les tissus humains et a été identifié comme une protéine mitochondriale. SIRT5, chez la Souris, est localisé dans l'espace intermembranaire des mitochondries (Nakamura et al., 2008), mais aucune fonction n'a été trouvée à ce jour (**Figure 17**).

SIRT6, chez l'Homme, est exprimé ubiquitairement et localisé dans le noyau. Chez la souris, SIRT6 est également hautement exprimé. Cette protéine est détectable dans tous les types de tissus avec de hauts niveaux d'expression dans le cerveau, le foie, le cœur, le muscle squelettique et le thymus (Liszt et al., 2005; Mostoslavsky et al., 2006) et est une protéine nucléaire, associée avec la chromatine de manière prédominante. SIRT6, chez la Souris, possède une robuste activité ADP-ribosyltransférase, ce qui signifie en d'autres termes que SIRT6 catalyse sa propre mono-ADP-ribosylation (Liszt et al., 2005). Cependant, SIRT6 a également une activité déacétylase (Mostoslavsky et al., 2006). L'analyse des souris *sirt6*^{-/-} révèle que SIRT6 empêche les lésions sur l'ADN, spécialement les lésions simple-brins et maintient la stabilité génomique par l'intermédiaire de la Polymérase β (Mostoslavsky et al., 2006). Chez l'Homme, SIRT6 exerce une activité déacétylase NAD-dépendante *in vivo* sur la lysine 9 de l'histone H3 et contribue ainsi au maintien des télomères (Michishita et al., 2008) (**Figure 17**).

SIRT7 est exprimé ubiquitairement dans les tissus humains, alors que chez la souris, SIRT7 est extrêmement peu exprimé dans les tissus non-proliférants comme le muscle, le

cœur, et le cerveau et hautement dans les tissus comme le foie, le testicule, et la rate (Ford et al., 2006). SIRT7 est spécifiquement localisé dans le noyau des cellules humaines et murines (Michishita et al., 2005; Ford et al., 2006). SIRT7 interagit avec la Polymérase I et est requise pour la machinerie de transcription de l'ARN Polymérase I dans des cellules en culture (Ford et al., 2006). Aucune cible de SIRT7 n'a été clairement identifiée, cependant chez les souris *sirt7*^{-/-}, on a observé une hyperacétylation de p53, d'où la suggestion d'une implication de SIRT7 dans la prévention de l'apoptose (Vakhrusheva et al., 2008) (**Figure 17**).

Sirtuines	Localisation intracellulaire	Activité enzymatique	Cible cellulaire	Fonction biologique
SIRT1	Noyau Cytoplasme	Déacétylation	AceCS1, LXR, PGC1-alpha	Métabolisme lipidique
			PGC1-alpha, FoxO1, H3	Métabolisme glucidique
			IRS2, FoxO3	Résistance au stress
			p53, Ku70, FoxO3, beta-Caténine, NF-KappaB	Pro- ou anti-apoptose
SIRT2	Noyau Cytoplasme	Déacétylation	Alpha-Tubuline	Progression du cycle cellulaire Point de contrôle mitotique Différentiation
			H4K16 FoxO1	Progression du cycle cellulaire Différentiation
			FoxO3a, p53	
SIRT3	Noyau Mitochondrie	Déacétylation	GDH AceCS2	Production d'AcétylCoA
SIRT4	Mitochondrie	ADP-ribosylation	GDH IDE ATP/ADP translocase	Sécrétion d'insuline
SIRT5	Mitochondrie			
SIRT6	Noyau	ADP-ribosylation	SIRT6	Structure de la chromatine
		Déacétylation	Polymérase beta H3K9	
SIRT7	Noyau	?	Complexe PolI	Transcription ADNr
		Déacétylation	p53	Prévention de l'apoptose

Figure 17. Principales propriétés des sirtuines chez les mammifères.

2.4.2.2. Réactions enzymatiques effectuées par les sirtuines

La réaction de déacétylation, catalysée par SIRT1, 2, 3, et 5 consiste tout d'abord au clivage de la liaison glycosidique entre la nicotinamide et le ribose du NAD⁺, puis à la libération du nicotinamide, et au transfert du radical acétyl d'une protéine acétylée sur l'ADP-ribose avec production de 2'-O-acétyl-ADP-ribose (2'-OAADPr) et de protéine désacétylée (Denu, 2003; 2005; Michan and Sinclair, 2007) (**Figure 18**). La réaction d'ADP-ribosylation, catalysée par SIRT4 et 6, consiste au clivage de la liaison glycosidique entre la base nicotinamide et le ribose du NAD⁺, puis à la libération du nicotinamide et au transfert du radical ADP-ribosyl sur une protéine (**Figure 18**).

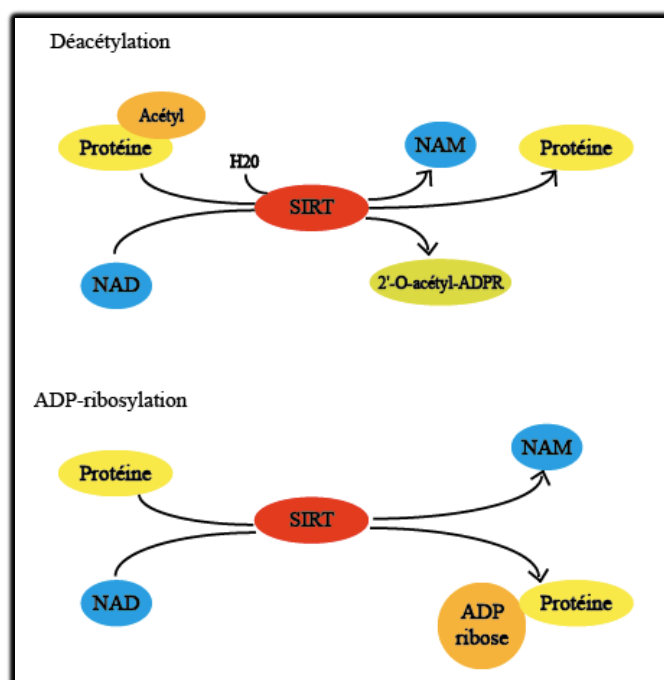


Figure 18. Les réactions catalysées par les sirtuines.

2.4.3. SIRT1 ((Silent mating type information regulation 2 homolog) 1)

2.4.3.1. Organisation génomique

Le gène *Sirt1* est le gène des sirtuines, chez les mammifères, possédant le plus d'homologie de séquence avec le gène *sir2* (Frye, 1999). Le gène *sirt1* humain se situe sur le bras long du chromosome 10 au niveau du locus 21.3. Il est composé d'une région de 33,7 kb environ comprenant 9 exons d'une taille allant de 80 pb pour l'exon 6 à 2120 pb pour l'exon 9. Le domaine catalytique hautement conservé entre les différentes espèces se situe entre les exons 3 et 8. L'ARN messager de *sirt1* humain d'une taille de 4107 pb code pour une protéine composée de 747 acides aminés.

2.4.3.2. La protéine SIRT1

La protéine SIRT1 humaine, composée de 747 acides aminés pour un poids moléculaire de 81,7 kD, comporte 4 régions:

- La région N-terminale regroupant les acides aminés de 1 à 180 (exons 1 et 2)
- Le site allostérique allant de l'acide aminé 181 à 243 (exons 2 et 3)
- Le site catalytique regroupant les acides aminés 244 à 498 (exons 3, 4, 5, 6, 7, et 8)
- La région C-terminale allant de l'acide aminé 499 à 747 (exons 8 et 9).

La structure tridimensionnelle de la protéine SIRT1 apparaît désordonnée avec de longues régions flexibles N- et C-terminales. Le site catalytique, commun aux différentes sirtuines humaines, possède deux domaines particuliers, le pli Rossman, et un petit sous-domaine où se localise un atome de zinc (Huhtiniemi et al., 2006). A l'interface de ces deux domaines, se trouve le site de liaison pour le NAD⁺: la molécule de NAD⁺ s'insère dans une poche spécifique constituée d'une partie hydrophobe du petit sous-domaine et d'une partie hydrophile du pli Rossman. La boucle flexible permet un réarrangement structural durant la fixation du NAD⁺, essentiel pour la catalyse (Avalos and Boeke, 2004). L'ion zinc est coordonnée de façon tétraédrique par les groupements thiols de 4 cystéines (371, 374, 395 et 398) plissées dans une structure unique. Ce domaine de liaison au zinc joue un rôle important lors de la liaison spécifique de Sirt1 au substrat. Le site allostérique, composé de quatre

hélices α , se situe entre la région N-terminale et le corps catalytique. Ainsi, il peut contrôler l'activité catalytique par changements conformationnels.

2.4.3.3. Régulation du niveau d'expression de SIRT1

Bien que SIRT1 soit ubiquitaire, son niveau d'expression varie d'un tissu à l'autre (Frye, 1999) en fonction de nombreuses conditions physiologiques (Kwon, 2008). La restriction calorique, chez les rongeurs et les humains, stimule l'expression de *sirt1* aussi bien dans le muscle, le Cœur ou le tissu adipeux, alors qu'un régime gras tend à diminuer son expression (Nisoli et al., 2005; Civitarese et al., 2007; Sun et al., 2007). Cependant, l'expression de *sirt1* semble être régulée de manière différente dans le foie puisque l'expression de *sirt1* est réduite en cas de restriction calorique et augmentée par un régime gras (Chen et al., 2005a). Lors du vieillissement, l'expression de Sirt1 diminue dans le cœur ou le thymus mais augmente en cas de maladie comme le cancer et les maladies neurodégénératives (Sakamoto et al., 2004; Kim et al., 2007; Prozorovski et al., 2008) mais le rôle exact de Sirt1 dans ces processus reste encore à élucider. L'expression de *sirt1* peut également augmenter dans le muscle strié squelettique chez des rats soumis à un exercice d'endurance ou à un entraînement musculaire (Suwa et al., 2008). Enfin, l'expression protéique de *sirt1* est stimulée en cas d'hypoxie (Rathbone et al., 2009; Kume et al., 2010).

Le facteur de transcription FoxO (Forkhead box O) 3a contrôle la transcription de *sirt1* (Nemoto et al., 2004). En effet, dans des cellules cancéreuses neuronales PC12 soumises à un jeûne, FoxO3a est transloqué dans le noyau où il se lie aux éléments de réponse du facteur de transcription p53 du promoteur de *sirt1*. Cette liaison déstabilise l'interaction de p53 sur le promoteur de *sirt1*. Etant donné que p53 réprime l'expression du gène Sirt1, le recrutement de FoxO3a active la transcription de *sirt1* (Nemoto et al., 2004; Kwon et al., 2008). L'expression de *sirt1* est aussi sous le contrôle du facteur de transcription E2F1 (Wang et al., 2006), facteur intervenant dans la régulation du cycle cellulaire (Nahle et al., 2002) et induisant l'apoptose en cas d'augmentation de la prolifération (Pützer, 2007). E2F1 induit l'expression de Sirt1 en réponse au stress génotoxique (Wang et al., 2006). En effet, une transfection d'E2F1 chez des cellules cancéreuses H1299 aboutit à la fois à l'augmentation du niveau d'expression de SIRT1 et de son ARNm, mais aussi à l'activation du promoteur *sirt1* (Wang et al., 2006). Enfin, le suppresseur de tumeur HIC (Hypermethylated In Cancer) 1 peut réguler *sirt1* en le réprimant transcriptionnellement tout en coopérant avec p53 pour éteindre le développement de cancers liés au vieillissement (Wales et al., 1995; Guerardel et al., 2001). Dans des cellules

cancéreuses, la présence d'HIC1 réprime la transcription de *sirt1*, ce qui aboutit à l'acétylation et l'activation de p53, responsable d'un arrêt de la croissance et d'une stimulation de l'apoptose. Au contraire, en cas de perte d'expression d'HIC1, *sirt1* est surexprimée induisant la déacétylation et l'inactivation de p53, aboutissant ainsi à une augmentation du risque de développement tumoral (Chen et al., 2005b). *sirt1* a donc des propriétés anti-apoptotiques et pro-oncogéniques en cas d'inactivation d'HIC1.

2.4.3.4. Régulation de l'activité de SIRT1

Trois protéines majeures sont capables de réguler l'activité de Sirt1 par une liaison directe protéine-protéine, AROS (Active Regulator Of Sirt1), DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1), et SENP1 (Sentrin-specific Protease 1).

AROS est un activateur de SIRT1. En effet, AROS se lie à la région N-terminale de SIRT1, ce qui augmente la déacétylation p53-dépendante de SIRT1, inhibant ainsi l'activité transcriptionnelle de p53 (Kim et al., 2007). Cette interaction entre AROS et SIRT1 induit un changement de conformation de structure de SIRT1 augmentant l'efficacité enzymatique de son site catalytique (Kim et al., 2007).

DBC1 a été identifiée à l'origine comme un gène récessif délété dans les cancers du sein, et codant pour une protéine impliquée dans les processus apoptotiques. Des études ont montré que DBC1 peut former un complexe stable avec SIRT1 *in vivo* et *in vitro* et réguler négativement son activité (Zhao et al., 2001; Kim and Um, 2008). DBC1 interagit directement avec le domaine catalytique de SIRT1 au moyen d'un motif "leucine zipper" (Anantharaman and Aravind, 2008; Kim and Um, 2008), ce qui empêche probablement l'accès des substrats de SIRT1 à son site catalytique, puisqu'une surexpression de DBC1 diminue la liaison et la déacétylation de substrats de SIRT1, tels que p53 ou FoxO3a. Dans le cas du cancer du poumon, par exemple, la régulation négative de SIRT1 par DBC1 empêche la tumorigénèse (Sung et al., 2010).

Enfin, l'activité de SIRT1 peut également être modulée par les SENP désomoylases, capables d'effectuer la modification post-traductionnelle de sumoylation. En effet, dans des cellules DU145, la sumoylation de la lysine 734 de SIRT1 entraîne une augmentation de son activité. Inversement, une mutation de cette lysine en arginine, ainsi qu'une désomoylation de SIRT1 par SENP1 aboutit à une inhibition de l'activité de Sirt1 (Yang et al., 2007).

2.4.4. Fonctions régulatrices de SIRT1

2.4.4.1. SIRT1 et Métabolisme

2.4.4.1.1. Le métabolisme du glucose

La néoglucogenèse hépatique est le mécanisme le plus important de production de glucose dans les organismes supérieurs et fournit les autres organes avec cette énergie au cours du jeûne. SIRT1 contrôle les voies glycolytiques/néoglucogéniques dans le foie, en réponse aux signaux de jeûne, par l'intermédiaire du co-facteur PGC-1 α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 alpha) (Rodgers et al., 2005). En effet, SIRT1, dont l'expression est induite par le jeûne *in vivo* (Rodgers et al., 2005), et par le pyruvate ou le sérum d'animaux en restriction calorique *in vitro* (Cohen et al., 2004b; Nisoli et al., 2005; Rodgers et al., 2005), active PGC-1 α en le déacétylant, ce qui favorise l'activité transcriptionnelle du complexe PGC-1 α /HNF4 α dans les cellules de foie. Ce mécanisme permet une surexpression de la voie néoglucogénique et une sous-expression de la glycolyse (Rodgers et al., 2005). Dans les hépatocytes, la déacétylation par SIRT1 favorise la transcription des gènes néoglucogéniques, dépendante de FoxO1, initiant ainsi la libération du glucose. De façon intéressante, la diminution hépatique *in vivo* de SIRT1 diminue la production de glucose hépatique et entraîne une hypoglycémie, une augmentation de la tolérance au glucose, et de la sensibilité à l'insuline (Rodgers and Puigserver, 2007). Ce phénotype est à mettre en rapport avec la diminution de l'expression des enzymes néoglucogéniques en conditions de jeûne, phénomène qu'on attribue à l'inhibition *in vivo* de la déacétylation de PGC-1 α par SIRT1 (Rodgers and Puigserver, 2007). Ces effets sont réversibles dans le foie, quand on surexprime SIRT1 (Rodgers and Puigserver, 2007). Néanmoins, de façon surprenante, chez la souris, les molécules activant SIRT1 causent les mêmes effets physiologiques sur l'homéostasie du glucose, c'est à dire, une augmentation de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline (Baur et al., 2006; Lagouge et al., 2006; Milne et al., 2007; Feige et al., 2008). Cette contradiction peut être expliquée par le fait que le foie ne serait pas le seul organe responsable de l'homéostasie du glucose.

La capacité de l'insuline à stimuler l'absorption du glucose et le métabolisme dans les tissus périphériques est essentielle pour une homéostasie normale du glucose. Des inhibiteurs de l'action de l'insuline, incluant la protéine ubiquitaire PTP1B (Protein Tyrosine Phosphatase

1B), ont la capacité de déphosphoryler le récepteur à l'insuline et d'interférer avec la signalisation de l'insuline. SIRT1 améliore cette signalisation dans des états résistants à l'insuline, en partie en inhibant l'expression de PTP1B (Sun et al., 2007). SIRT1 est régulée de façon négative dans les lignées cellulaires musculaires et hépatiques résistantes à l'insuline, et dans le muscle gastrocnémien des souris résistantes à l'insuline. Dans ce contexte, la surexpression ou l'activation de SIRT1 par le resvératrol améliore la résistance à l'insuline, effet qui, *in vitro*, est dû à la répression de PTP1B par la déacétylation de l'histone H3 (Sun et al., 2007; Kume et al., 2010). De façon parallèle, les souris, surexprimants SIRT1 dans les cellules pancréatiques, montrent une augmentation de leur tolérance au glucose. Cet effet corrèle à l'augmentation de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose et une diminution de l'expression d'UCP2 (Uncoupling Protein 2) (Moynihan et al., 2005). En effet, SIRT1 réprime l'expression d'UCP2 en se liant directement au promoteur UCP2 (Sun and Allis, 2002; Bordone et al., 2006). Ce processus permet l'augmentation de la production d'ATP en réponse à la stimulation du glucose dans les cellules, favorisant ainsi la sécrétion d'insuline (Bordone et al., 2006).

2.4.4.1.2. Le métabolisme lipidique

Chez les mammifères, la plupart de l'énergie est stockée sous forme de graisses dans les tissus adipeux. Le tissu adipeux blanc libère des acides gras qui sont utilisés comme énergie par les autres organes au cours du jeûne. Le facteur de transcription PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma) régule le stockage de la graisse, en contrôlant l'expression des gènes impliqués dans l'adipogenèse. SIRT1 interagit avec le co-répresseur NCoR et SMRT. Ce complexe SMRT/NCoR/SIRT1 se lie aux éléments de réponse à PPAR γ et inhibe ainsi la liaison de PPAR γ . Ce mécanisme réprime, en conséquence, l'expression des gènes cibles PPAR γ et l'accumulation de graisse (Picard et al., 2004).

SIRT1 favorise indirectement l'activité de LXR (Liver X Receptor), qui joue également un rôle dans le métabolisme lipidique. LXR est une superfamille de récepteurs nucléaires fonctionnant comme des hétérodimères avec les récepteurs aux rétinoïdes. LXR régule le transport inverse du cholestérol, un processus par lequel HDL (High Density Lipoprotein) guide le cholestérol des tissus périphériques jusqu'au foie, où là, il peut être sécrété en bile. Des défauts dans ce mécanisme peuvent entraîner une accumulation de cholestérol hépatique. En plus du transport inverse de cholestérol, les LXRs affectent aussi le

métabolisme de la graisse, par l'intermédiaire de l'induction transcriptionnelle de *SRBEP-1c* (Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c) affectant la lipogenèse hépatique. La déacétylation de LXR par SIRT1, son ubiquitination et sa dégradation par la voie du protéasome, favorise le renouvellement de la protéine LXR et induit l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de LXR comme *ABCA1* (Kraus and Lis, 2003; Li et al., 2007). Les souris *sirt1*^{-/-} ont un défaut d'homéostasie du glucose, suggérant que SIRT1 a des effets bénéfiques sur le transport inverse du cholestérol *in vivo* (Li et al., 2007). Une démonstration récente, que l'expression de *CYP7A1* est réduite en absence de SIRT1, suggère également que la synthèse d'acides biliaires est augmentée par SIRT1 (Rodgers and Puigserver, 2007). Cependant, l'administration de resveratrol activant SIRT1, n'a pas d'impact sur le niveau de cholestérol (Baur et al., 2006; Lagouge et al., 2006; Nathan et al., 2006). LXR est connu pour faciliter l'expression de *SREBP-1c* et par conséquent pour induire l'expression d'enzymes lipogéniques, comme par exemple, *AceCS1* (Acetyl-CoA Synthetase 1), une protéine cytoplasmique qui module la synthèse de l'Acétyl-CoA à partir d'acétate. SIRT1 induit l'activité LXR (Li et al., 2007), aussi bien que l'activité d'*AceCS1* (Hallows et al., 2006). En effet, SIRT1 déacétyle et active ainsi *AceCS1 in vitro* (Hallows et al., 2006). Puisque la surexpression d'*AceCS1* est connue pour augmenter la synthèse d'acides gras hépatiques, et que SIRT1 active directement LXR, le résultat paraît contradictoire avec le fait que la surexpression de SIRT1 réduise l'accumulation de graisse (Picard et al., 2004). Cependant, l'acétyl-CoA généré par *AceCS1* pourrait être impliqué dans les autres voies qui ont besoin d'acétyl-CoA, comme celles dépendantes des acétyltransférases. De plus, en contraste avec SIRT1, qui est induite au cours du jeûne, dans le tissu adipeux blanc (Picard et al., 2004) mais aussi dans le foie (Rodgers et al., 2005), les expressions hépatiques et adipeuses d'*AceCS1*, sont inhibées par le jeûne. Donc, *AceCS1* pourrait, dans des situations physiologiques, être résistant à l'activation de SIRT1. SIRT1 permet la lipogenèse hépatique, et il faut prendre en considération que SIRT1 peut induire le métabolisme oxydatif et ainsi limiter l'accumulation hépatique lipidique.

PGC-1 α , qui contrôle des processus importants comme la biogenèse mitochondriale, fait aussi parti du réseau transcriptionnel impliqué dans l'adaptation au stress nutritif par l'intermédiaire de la régulation de la néoglucogenèse et du métabolisme énergétique dans les tissus périphériques. PGC-1 α est en effet impliqué dans l'augmentation de l'oxydation des acides gras et dans la diminution de l'oxydation du glucose. Dans des conditions pauvres en glucose, SIRT1 est requis pour activer l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique (Gerhart-Hines et al., 2007). SIRT1 accomplit cette tâche en déacétylant et en activant ainsi

PGC-1 α sur des régions promotrices de gènes impliqués dans la respiration mitochondriale et l'oxydation des acides gras (Lagouge et al., 2006; Gerhart-Hines et al., 2007). La régulation négative hépatique de SIRT1 induit une accumulation d'aides gras libres dans le foie et réduit largement l'induction de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras (Rodgers and Puigserver, 2007). La surexpression de SIRT1 inverse partiellement l'effet de la sous-expression de SIRT1. Cette réponse dépend de PGC-1 α , puisque la sous-expression de PGC-1 α bloque l'induction par SIRT1 des gènes de l'oxydation des acides gras au cours du jeûne (Rodgers and Puigserver, 2007). L'utilisation *in vivo* des activateurs de SIRT1 chez les souris permettent de favoriser une augmentation de l'oxydation des acides gras dans les tissus métaboliques (Feige et al., 2008).

2.4.4.2. SIRT1 et Neuroprotection

SIRT1 semble jouer un rôle central dans les maladies du système nerveux central (Dali-Youcef et al., 2007). Sa fonction dans la dégénérescence Wallérienne est la plus intéressante. Lorsqu'une fibre nerveuse est sectionnée ou écrasée, la partie distale à la lésion (portion de l'axone séparée du corps cellulaire contenant le noyau) va dégénérer. Un modèle de souris *Wlds* (Wallerian degeneration slow) subit une un retard de dégénérescence axonale suite à une blessure axonale. Dans ce modèle, la réduction de l'activité de SIRT1 diminue la protection axonale généralement observée, alors que l'activation de SIRT1 par le resveratrol diminue la dégénérescence axonale après une blessure neuronale (Araki et al., 2004). La neuroprotection est donc complète chez les souris *Wlds* par l'intermédiaire de la réserve de NAD⁺ et/ou l'activité de SIRT1.

L'activation de SIRT1 diminue aussi significativement la mort cellulaire neuronale induite par les peptides Amyloides- β (A β). En effet, la plaque amyloïde, caractéristique de la maladie d'Alzheimer, est composé des peptides A β qui sont clivés à partir de la protéine précurseur Amyloïde (APP) par les β - et les γ -sécrétases. L'accumulation des peptides A β initie une cascade pathologique ayant pour effet d'aggraver la maladie d'Alzheimer. Les peptides A β peuvent induire l'activité de NF- κ B dans les microglies. Il est intéressant de noter que l'activation de SIRT1 réduit cette signalisation NF- κ B (Chen et al., 2005b), atténuant ainsi la neurotoxicité induite par les peptides A β et la réponse inflammatoire reliée à la maladie d'Alzheimer. En parallèle, la surexpression de SIRT1 dans le cerveau de souris empêche la genèse des peptides A β à travers, la stimulation du processus non-

amyloïdogénique d'APP initié par l'inhibition de l'expression de la kinase Rho 1, et l'augmentation inhérente de l'activité de l' α -sécrétase (Qin et al., 2006). Ces résultats sont en phase avec le fait que le resvératrol diminue le niveau des peptides sécrétés et intracellulaires A β en favorisant la dégradation affiliée du protéasome.

2.4.4.3. SIRT1 et Cancer

Beaucoup de facteurs contrôlant la prolifération cellulaire et l'apoptose ont été identifiés comme des substrats des sirtuines, à l'exemple de p53. En effet, dans les thymocytes de souris *sirt1*^{-/-}, les niveaux d'acétylation de p53 et d'apoptose induite par des radiations ionisantes sont significativement augmentés (Cheng et al., 2003). Inversement, la surexpression de SIRT1, menant à la déacétylation de p53, inhibe l'activité transcriptionnelle de p53 et l'apoptose dépendante de p53 suite à des liaisons à l'ADN et au stress oxydatif (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001). SIRT1 serait donc une sorte d'épée à double tranchant. En effet, chez les mammifères, SIRT1 favorise, soit la survie cellulaire (à travers des effets anti-apoptotiques) soit la tumorigenèse. Dans la même lignée, la perte de la fonction d'HIC-1 a pour conséquence la surexpression de SIRT1 (qui déacétyle et atténue la fonction de p53) et la tumorigenèse, (Chen et al., 2005b). De manière contrastée, p53 peut aussi avoir un rôle pro-apoptotique sous des conditions de stress modéré, en induisant l'expression de protéines qui protègent la cellule contre les ROS (Reactive Oxygen Species) (Sablina et al., 2005). Dans ce cas, la déacétylation par SIRT1, inactivant p53, favoriserait l'apoptose. SIRT1 déacétyle aussi le facteur de réparation de l'ADN Ku70, qui séquestre le facteur pro-apoptotique Bax en dehors de la mitochondrie, inhibant ainsi la mort cellulaire apoptotique induite par le stress (Cohen et al., 2004a). Dans la même veine, dans le noyau, SIRT1 et la forme déacétylée de FoxO3a forment un complexe qui induit l'arrêt du cycle cellulaire et une résistance au stress oxydatif, mais qui inhibe l'induction de l'apoptose par FoxO3a. De manière contrastée, SIRT1 empêche la tumorigenèse intestinale et la croissance du cancer du colon en déacétylant et donc en inactivant la β -caténine, un co-régulateur transcriptionnel qui habituellement dirige l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Firestein et al., 2008). Enfin, SIRT1 augmente l'apoptose en réponse au TNF α (Tumor Necrosis Factor α) par l'intermédiaire de sa capacité à inhiber la transactivation potentielle de NF- κ B (Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells) (Yeung et al., 2004). En conclusion,

grâce à la diversité de ses cibles cellulaires, il n'est pas clair que SIRT1 puisse être considéré comme un oncogène ou comme un suppresseur de tumeurs.

2.4.4.4. SIRT1 et transcription

2.4.4.4.1. Régulation de la structure de la chromatine

Histone H1

Pour étudier le rôle de SIRT1 dans le remodelage de la chromatine, Vaquero et al. ont effectué un test *in vitro* utilisant la protéine recombinante SIRT1, et ont pu constater que les quatre histones se retrouvent déacétylées, mais avec des cinétiques différentes et une spécificité apparente pour H3 et H4 (Vaquero et al., 2004). En utilisant des anticorps contre les résidus acétylés des histones, ces mêmes auteurs ont déterminé une spécificité de SIRT1 pour H4-K16 *in vitro*. En effet, l'inhibition de SIRT1 par la technique d'ARN interférence conduit à une augmentation de l'acétylation d'H4-K16 et à une diminution de la méthylation d'H4-K20, deux marques de chromatine silencieuse. Pour approfondir la fonction de SIRT1 dans le remodelage de la chromatine, Vaquero et al. ont isolé par chromatographie les protéines associées à SIRT1, et ont observé qu'elle interagit spécifiquement avec l'histone H1b, une isoforme d'H1 impliquée dans la formation de l'hétérochromatine. H1 est régulée par l'acétylation et H1K26 est le résidu cible pour la déacétylation (Vaquero et al., 2004).

Chez les eucaryotes unicellulaires, y compris *S. cerevisiae*, la délétion de l'histone H1 n'affecte pas la survie cellulaire mais raccourcit l'espérance de vie. L'histone H1 tient un rôle important dans la prolifération et la différenciation de la lignée germinale chez les eucaryotes pluricellulaires tels que *C. elegans*. En effet, H1 participe à l'établissement de la chromatine, sans être nécessaire à la formation de la chromatine d'ordre supérieure, mais en étant indispensable pour sa maintenance. Les changements effectués par H1 dans la structure de la chromatine d'ordre supérieure affectent la liaison d'autres protéines régulant la chromatine avec des effets ultimes sur l'expression des gènes. Le travail de Vaquero et al. fournit la preuve qu'avec l'histone H1, l'activité de SIRT1 peut influencer sur l'établissement de l'hétérochromatine, soit par déacétylation directe d'H1 et compaction de la chromatine, ou à travers la déacétylation des autres histones en combinaison avec les activités enzymatiques recrutées sur la chromatine à travers l'histone H1. Dans un tel rôle, SIRT1 peut influencer la structure globale de la chromatine (Vaquero et al., 2004).

SIRT1 dans les complexes répressifs Polycomb

Les modifications des lysines des histones sont des éléments importants de la machinerie épigénétique régulant la structure de la chromatine et l'expression génique. La méthylation des lysines est catalysée par les HKMT (Lysine-specific Histone Methyltransferases). Ezh2 (Enhancer of Zeste Orthologue 2) est un domaine SET méthyltransférase impliqué dans les PRCs (Polycomb Repressive Complex), principalement définis par l'isoforme d'Eed, l'orthologue humain Extra Sex Combs. Chaque isoforme Eed confère une spécificité au résidu lysine ciblé par le complexe PRC correspondant. PRC4 est purifié comme un nouveau PRC, en raison de son contenu exclusif en Eed2 et de sa spécificité vis à vis d'H1bK26 (Kuzmichev et al., 2005). SIRT1 est un composant de PRC4 à travers son association avec Su(z)12 (Suppressor of Zeste 12). De façon intéressante, un mutant SIRT1 catalytiquement inactif peut s'associer à Eed mais pas avec Ezh2. L'abondance du composant PRC change au cours de la différenciation et le cancer. Après induction de la différenciation, les cellules ES de souris ont des niveaux dépressifs d'Ezh2, Eed2, et de SIRT1 alors que les tissus cancéreux du sein et du colon ont des niveaux similaires d'expression des composants PRC4 par rapport aux tissus normaux. Pour déterminer la signification de cette observation, Kuzmichev et al. ont utilisé un modèle murin de cancer de la prostate qui porte des délétions monoalléliques à la fois du gène *Nkx3.1*, spécifique de la prostate et de la phosphatase lipidique Pten suppresseur de tumeur, et ont constaté que les niveaux des protéines SIRT1 et Ezh2 aussi bien que les niveaux d'ARNm d'Ezh2, Su(z)12 et d'Eed sont élevés. De façon similaire, les gènes cibles PRC sont touchés. Ainsi, SIRT1 participe à un complexe modifiant l'activité de la chromatine (Kuzmichev et al., 2005). Par conséquent, ces découvertes renforcent la notion selon laquelle un membre des sirtuines de mammifères participe à la régulation épigénétique de l'expression génique.

2.4.4.4.2. Régulation de la transcription

HIV Tat

La réplication d'HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus-1) dépend de la protéine Tat, un activateur transcriptionnel. Tat forme un complexe ternaire avec cyclin T1 et TAR (Trans-Acting Response element) dans la région 5' de tous les ARN messagers viraux. Ce complexe recrute CDK9 qui à son tour phosphoryle l'ARN polymérase III pour améliorer la processivité de l'enzyme. L'acétylation de Tat sur K50 par p300 durant les étapes

intermédiaires de la transcription empêche la formation du complexe Tat/CyclinT1/TAR. Tat acétylé est ensuite transféré sur la polymérase en élongation pour recruter pCAF au moyen d'un bromodomaine. Aux stades précoces de la réplication virale, la protéine Tat est cruciale pour diriger la transcription des ARNm jusqu'à une concentration critique qui peut soutenir la réplication virale. Basé sur ce modèle de l'action de Tat, la déacétylation de Tat aux stades précoces de la réplication virale est cruciale (Kwon et al., 2008).

Pagans et al. ont identifié SIRT1, SIRT2, et SIRT3 comme des déacétylases de Tat *in vitro* (Pagans et al., 2005). SIRT2 et SIRT3 sont exclus du noyau, et compte tenu de la localisation nucléaire de Tat et SIRT1, la possibilité d'un lien fonctionnel entre ces deux protéines existe. En effet, Tat et SIRT1 peuvent s'associer à la fois *in vitro* et dans les cellules les co-exprimants. SIRT1 améliore la transcription dirigée par Tat d'une manière dépendante à l'activité enzymatique de SIRT1 et indépendante aux sites promoteurs NF- κ B.

A l'inverse, l'ARN interférant ciblant SIRT1 réduit l'activité transcriptionnelle de Tat. La transcription dirigée par Tat diminue dramatiquement dans les Mef *sirt1*^{-/-}, mais la réintroduction de SIRT1 peut inverser cet effet. SIRT1 a un rôle dans la réplication de HIV et peut donc être une cible pharmacologique dans le futur (Pagans et al., 2005).

CTIP1 et CTIP2

CTIP1 et CTIP2 (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor (COUP-TF)-interacting proteins 1 and 2) sont des facteurs de transcription qui interagissent avec COUP-TF et augmente la répression transcriptionnelle dépendante de COUP-TF. Elles prennent en charge la répression transcriptionnelle indépendamment de COUP-TF puisqu'elles peuvent se lier directement à une séquence d'ADN définie et elles sont exprimées dans les cellules hématopoïétiques d'origine lymphoïde qui n'expriment pas COUP-TF. L'analyse de perte de fonction chez les souris, aussi bien que les résultats montrant des aberrations génétiques sur les loci CTIP1 et CTIP2, ont fourni des corrélations significatives dans la dérégulation entre CTIP1 et CTIP2 et des blessures hématopoïétiques (Senawong et al., 2003).

Les répressions engendrées par CTIP1 et CTIP2 sont indépendantes des HDACs de classe I/II sur la base de leur sensibilité à la TSA. Senawong et al. ont montré que la nicotinamide pouvait réduire la répression induite par CTIP2, ce qui corrèle l'effet de la nicotinamide sur l'augmentation de l'acétylation H3/H4 (Senawong et al., 2003). SIRT1 participe à la répression guidée par CTIP2, de manière dépendante à son activité enzymatique. SIRT1 interagit via son "core domain" avec CTIP2 *in vivo* et *in vitro* (Senawong et al., 2005).

TAFI68

En dehors de la transcription de la PolII, le remodelage de la chromatine est également impliqué dans la régulation des gènes transcrits par la PolII, codant principalement pour l'ADN ribosomal. TTF-I (Transcription Termination Factor I) est nécessaire pour le recrutement des complexes de remodelage de la chromatine sur les promoteurs PolII ce qui rend la chromatine accessible à la machinerie transcriptionnelle. TTF-I est capable de lier l'acétyltransférase PCAF, qui acétyle spécifiquement la sous-unité TAFI68 (TATA-box binding protein-Associated Factor I of 68kDa) du promoteur TIF-IB/SL-1 à la fois *in vivo* et *in vitro*. De façon similaire aux autres protéines acétylées, TAFI68 peut aussi se lier à PCAF (Muth et al., 2001). De façon intéressante, TAFI68 est aussi acétylé *in vivo* et cette acétylation peut se produire quand il est lié à l'holocomplexe TIF-IB/SL-1. TAFI68 acétylé est capable de diriger la transcription de façon plus puissante par rapport à la forme non-acétylée ce qui suggère que l'augmentation de la liaison de TAFI68 à l'ADN via l'acétylation peut réguler la transcription des gènes ADN_r (Muth et al., 2001).

De façon intéressante, le traitement des cellules avec TSA n'affecte pas la transcription de l'ADN_r des transcrits pre-ARN_r, suggérant que les HDACs ne sont pas des déacétylases physiologiques régulant la transcription de l'ADN_r. Inversement, SIRT1 peut déacétyler TAFI68 *in vitro* et cette déacétylation diminue la transcription des ADN_r (Muth et al., 2001).

La régulation des répresseurs Hes1/Hey2 bHLH

La famille de facteurs de transcription bHLH (basic helix-loop-helix) comprend à la fois des activateurs et des répresseurs, qui diffèrent en présence de motifs régulateurs distincts. Ces motifs sont censés servir de médiateur à l'interaction avec les co-répresseurs, qui à leur tour prennent en charge le recrutement de facteurs modifiant la chromatine comme les déacétylases qui mettent en oeuvre la répression transcriptionnelle. Le site de liaison de SIRT1 se fait sur le domaine bHLH des deux protéines humaines HES1 (hairy and enhancer of split-1) et HEY2 (Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 2) (Takata, 2003). SIRT1 augmente la répression guidée par chaque facteur, et son activité enzymatique n'est pas requise pour cet effet. SIRT1 peut être un nouveau régulateur de l'activité de répression transcriptionnelle du facteur humain bHLH. L'interaction de SIRT1 avec les répresseurs bHLH est importante, puisque récemment, des études ont suggéré que HES1 régule directement la transcription de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27. Des souris *hes1*^{-/-} montrent des défauts développementaux attribués à une réduction de la prolifération ce qui

corrèle avec l'augmentation des niveaux d'ARNm p27. En effet, Hes1 peut se lier à des éléments sur le promoteur de p27 et réprimer son activité (Murata et al., 2005). De façon intéressante, les souris *sirt1*^{-/-} exhibent des défauts de développement cardiaques et rétinaux similaires respectivement aux souris déficientes pour *hey2* et *hes1* (Cheng et al., 2003).

Bcl-6

Bcl-6 est un protooncogène qui code une protéine nucléaire de la famille BTB/POZ (Bric-à-brac, tramtac, broad complex/Pox virus zinc fingers). Il est requis pour la formation du centre de la lignée germinale, impliqué dans la pathogenèse des lymphomes à cellules-B. Bcl-6 agit comme un répresseur transcriptionnel en recrutant les complexes co-répresseurs contenant des HDAC incluant notamment SMRT et Sin3A. Cette fonction dépend du domaine de liaison à l'ADN en doigt de zinc, du domaine POZ N-terminal, et d'un domaine additionnel de répression localisé au milieu de la molécule. L'activité répressionnelle est régulée par l'acétylation (Pasqualucci et al., 2003). En particulier, Bcl-6 interagit avec p300 et devient acétylé par cette dernière. Cette acétylation diminue son activité répressive transcriptionnelle et induit la dissociation de Bcl-6 d'HDAC2.

Les sirtuines, et plus particulièrement SIRT1, sont impliquées dans la régulation de l'acétylation de Bcl-6, basée sur sa sensibilité à la nicotinamide. En effet, Bcl-6 réprime directement les gènes cibles de p53, et par conséquent inhibe l'apoptose dépendante de p53 et l'arrêt du cycle cellulaire faisant allusion au fait que ces protéines peuvent être régulées en coordination par l'acétylation. SIRT1 peut donc induire la répression transcriptionnelle en déacétylant et en activant des répresseurs transcriptionnels comme Bcl-6 (Pasqualucci et al., 2003).

2.4.4.4.3. Régulation des facteurs de transcription

La répression de MyoD par SIRT1

MyoD est un facteur de transcription basique hélice-boucle-hélice (bHLH) qui collabore avec le facteur de transcription MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) permettant l'induction des programmes d'expression génique qui dirigent la différenciation musculaire (Fulco et al., 2003). SIRT1 inhibe la transcription dirigée par MyoD et MEF2 et atténue la différenciation musculaire par une sous-expression des gènes spécifiques des muscles. SIRT1 est dans un complexe ternaire avec PCAF et MyoD et est capable de déacétyler ces deux facteurs *in vitro* et *in vivo*. Puisque l'acétylation de MyoD est importante pour son activité

transcriptionnelle complète, il est possible que la déacétylation de MyoD par SIRT1 dirige les effets de la différenciation musculaire (Fulco et al., 2003). De façon contraire, l'activité de SIRT1 régule l'acétylation d'H3K9 et H3K14 sur les promoteurs des gènes spécifiques des muscles impliquant que SIRT1 pourrait réguler directement l'accessibilité au promoteur à travers les modifications de la chromatine. En modulant le ratio intracellulaire (NAD⁺)/(NADH) couplé à la sous-expression de SIRT1 par ARN interférant, les effets du statut redox intracellulaire sur la différenciation musculaire sont dirigés par SIRT1.

L'interaction fonctionnelle de SIRT1 avec HDAC4 pour réguler la répression de MEF2

La déacétylase de classe II HDAC4 interagit avec MEF2 via un domaine N-terminal MITR (MEF2-Interacting Transcriptional Repression) et réprime l'expression de gènes spécifiques des muscles. HDAC4 et SIRT1 agissent en synergie pour induire la répression de MEF2. SIRT1 déacétyle MEF2 sur K424 ce qui permet sa sumoylation par l'activité SUMO recrutée par HDAC4. SIRT1 agit avec une autre HDAC pour réprimer l'expression génique dans un mécanisme autre que la déacétylation des histones (Zhao et al., 2005).

3. But du projet

Mon projet de thèse vise à comprendre le mécanisme moléculaire par lequel l'histone déacétylase SIRT1 contrôle l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et le métabolisme énergétique.

L'acétylation joue un rôle important dans le contrôle de l'expression génique. De nombreux activateurs transcriptionnels possèdent une activité Histone Acétyltransférase et un grand nombre de répresseurs, une fonction Histone Déacétylase. Ces enzymes, en plus de cibler les histones, affectent l'activité d'un grand nombre de facteurs de transcription, ce qui permet de moduler l'activité de leurs gènes cibles. SIRT1, prototype de la famille des sirtuines, est une enzyme catalysant les réactions enzymatiques de déacétylation NAD-dépendante et d'O-ADP-ribosylation. Par sa dépendance au NAD, SIRT1 se positionne comme un senseur du statut énergétique de la cellule liant le métabolisme énergétique à l'expression des gènes. Comme nous venons de le voir au cours de l'introduction, SIRT1 joue un rôle majeur dans de nombreux processus biologiques, notamment les voies métaboliques du glucose et des lipides ainsi que la transformation cellulaire ; SIRT1 contrôle les facteurs clés de ces phénomènes en régulant leur expression.

Pour étudier le rôle de SIRT1 dans le contrôle l'expression génique, nous avons dans un premier temps utilisé une approche moléculaire combinée à de la protéomique pour identifier les partenaires protéiques associés à SIRT1 dans des cellules de fibroblastes embryonnaires de Souris (Mef). Nous avons ainsi montré que SIRT1, le marqueur de prolifération cellulaire Ki67, et le complexe TFIIC coexistent au sein d'un même complexe macromoléculaire. Ceci nous a permis de relier directement SIRT1 à la prolifération cellulaire et au contrôle de la machinerie de transcription de la PolIII.

Afin d'évaluer le rôle de SIRT1 dans le contrôle de la transcription PolIII, nous avons dans un deuxième temps examiné l'effet de la délétion de *sirt1* sur la régulation de la transcription par l'ARN Polymérase III et la prolifération cellulaire. Pour se faire, nous avons utilisé des lignées cellulaires Mef invalidées ou non pour le gène *sirt1* en parallèle avec un modèle murin invalidé pour *sirt1* (*sirt1*^{-/-}). Nous avons montré que SIRT1 régule la prolifération cellulaire en contrôlant le niveau de transcription des séquences répétées SINEs et LINEs qui sont directement sous le contrôle de la PolIII.

Pour mieux comprendre la relation entre SIRT1 et ses partenaires protéiques, nous avons étudié le lien entre l'activité enzymatique de SIRT1 (histone déacétylase) et la machinerie de transcription de la PolIII. Nous avons analysé l'effet de la délétion de *sirt1* ou de la mutation de son activité enzymatique sur la fonction des complexes protéiques associés à SIRT1 (TFIIC et Ki67). Nous sommes arrivés à la conclusion que l'activité enzymatique de

SIRT1 est requise pour sa fonction de régulateur. Nous avons également montré que la délétion de *sirt1* conduit à la dissociation de Ki67 du complexe SIRT1 et à la surexpression des gènes sous contrôle de la PolIII (essentiellement les séquences *répétées* SINEs et LINEs). La surexpression des séquences *répétées s'accompagne également du recrutement de l'histone acétyltransférase* PCAF et de la variante d'histone H3.3 ainsi que de sa chaperone de déposition sur la chromatine DAXX ; des marques souvent associées à la chromatine transcriptionnellement active. Ces résultats suggèrent fortement que SIRT1 contrôle négativement la machinerie de transcription de la PolIII.

Enfin, pour déterminer l'importance de la relation entre Ki67, SIRT1 et la transcription des SINEs et des LINEs, durant la prolifération cellulaire, nous avons utilisé des cellules musculaires C2C12 en conditions de prolifération et de différenciation. Nous avons montré que l'extinction de Ki67 lors de la différenciation musculaire conduit à la surexpression des séquences *répétées* SINEs et LINEs. Ce résultat a été reproduit dans des cellules Mef invalidées pour Ki67 par shRNA. Nos travaux suggèrent que SIRT1 coopère avec Ki67 pour réguler négativement la transcription PolIII, et la prolifération cellulaire.

Les études que nous avons réalisées nous ont permis de démontrer que SIRT1 et Ki67 ont un rôle de répresseur de la transcription de la PolIII. Ces deux protéines sont interdépendantes et interagissent ensemble. Nos travaux décrivent pour la première fois les bases moléculaires d'un nouveau mécanisme de repression transcriptionnelle utilisant Ki67 et SIRT1 pour réprimer la transcription PolIII et réguler négativement la prolifération cellulaire.

4. Résultats

The SIRT1 complex contains the proliferative marker Ki67 and regulates PolIII-dependent transcription of LINE containing sequences

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, the Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7104, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U964, Université de Strasbourg, Parc d'innovation, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch Cedex, France

*Corresponding author:

Dr Ali Hamiche

IGBMC

1, rue Laurent Fries

67404 Illkirch cedex

E-mail: hamiche@igbmc.fr

Phone: +33 388 653 250

Abbreviations: SIRT1, silent mating type information regulation 2 homolog;

Introduction

SIRT1 (silent mating type information regulation 2 homolog) 1, the mammalian homolog of yeast Sir2, is a NAD⁺-dependent histone deacetylase belonging to the sirtuin family (Houtkooper et al., 2012). They consume one NAD⁺ for every acetyl group being removed. Indeed, the reaction begins with a cleavage of NAD⁺ and formation of nicotinamide (NAM) and ADP-ribose, followed by the generation of *O*-acetyl ADP ribose and the deacetylated substrate (Araki et al., 2004). The catalytic site of sirtuins, such as that of SIRT1, possesses two structural domains, the Rossmann fold and a smaller sub-domain composed of a helical module and a zinc-binding module. A large groove at the interface between these domains creates the active site where NAD⁺ and the acetylated substrate bind (Huhtiniemi et al., 2006).

Sirtuins activity is linked to gene repression, metabolic control, apoptosis and cell survival, DNA repair, development, inflammation, neuroprotection, and healthy aging (Houtkooper et al., 2012). During the mouse embryogenesis SIRT1 is highly expressed in spinal cord, brain and dorsal root ganglion (Sakamoto et al., 2004), but also in the adult brain, where it localizes with high levels in the cerebellum, cortex, hippocampus and hypothalamus (Ramadori et al., 2008). Alteration of sirtuins are particularly involved in neurodegenerative diseases, such as Alzheimer disease, Parkinson disease and Huntington disease, which makes them as interesting therapeutic targets. Indeed, it has been shown that modulation of SIRT1 activity by genetic or pharmacological manipulation impacts neurodegenerative models (Donmez et al., 2012).

Sirtuins are repressive factors of gene transcription because they catalyse the removing of acetyl groups from lysine by hydrolysis, both on histones and non-histone proteins. When acting on proteins such as p53, HIF1a, NFκB, E2F1, or FOXO1 (Rajendran et al., 2011; Houtkooper et al., 2012), sirtuins regulate their activity and when acting on histones, e.g. histone H3, they induce a condensed structure of chromatin, refractory to gene transcription. SIRT1 is not an exception to this rule considering that it has been reported that SIRT1 mediates transcriptional repression, heterochromatin formation and heritable gene silencing (Donmez et al., 2012).

At the molecular level, SIRT1 is a nuclear protein (Michishita et al., 2005) tethered to the promoters of methylated silenced tumor suppressor genes (Pruitt et al., 2006). When down-regulating SIRT1, it was likely found a recovery of the expression of these genes. This

re-expression was observed to associate with an increase of acetylated H3K9 and H4K16 (Vaquero et al., 2004). Beside its role in gene expression regulation SIRT1 also appears to be involved in DNA repair process. Indeed, the involvement of TIP60, a histone acetyltransferase that acetylates H4K16 in response to DNA damage (Murr et al., 2006), is followed by the action of SIRT1 at the same residue, as a consequence of its recruitment to the break site (O'Hagan et al., 2008). It was suggested that that this deacetylation is important to return the chromatin back to its original state following DNA repair (O'Hagan et al., 2008). Furthermore, the action of SIRT1 in DNA repair may also go through the regulation of p53 as SIRT1 decreases its transcriptional activity via deacetylation. The effect of SIRT1 activity on p53 may be influenced by AROS (Active Regulator of Sirt1), known to act as stimulating co-factor of SIRT1 (Kim et al., 2007). The interaction of SIRT1 and AROS induces a conformational change of SIRT1, which enhances the efficiency of the catalytic site of SIRT1 (Kim et al., 2007). In contrast, DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1) acts as a negative regulator of the enzymatic activity of SIRT1 by hindering the accessibility of the catalytic site to its substrate such as p53 or FOXO3a (Sung et al., 2010). Another protein interacting with SIRT1 and having regulatory properties, is SENP1 (Sentrin-specific Protease 1). SENP1 is a sumoylase that can enhance the activity of SIRT1 via the addition of a sumoyl group at lysine 734 (Yang et al., 2007). However, it is not yet known whether these proteins are permanent components of the SIRT1 complex.

Although, numerous partners have been reported for SIRT1, such as those described above, the macro-molecular complex to which it belongs has never been reported. SIRT1 has been identified as a part of the PRC2/3 complex, which is known to play a role in the initiation of chromatin silencing during development (Kuzmichev et al., 2002; 2004). Also SIRT1 has been found associated with the polycomb group complex (PRC4) known to contain the H3K27 inducing methylation enzyme EZH2 (Enhancer of Zeste Homologue 2) (Kuzmichev et al., 2005). Interestingly, SIRT1 was found to bind and to increase the activity of SUV39H1 the enzyme catalyzing the methylation of H3K9 (Vaquero et al., 2007). SIRT1 can also act on non-histone proteins in order to silence genes. One example is the targeting of DNA methyltransferase 1. Peng et al., recently observed that SIRT1 can deacetylate DNMT1 as several lysine residues some of which are activating while others were inhibitory, but down-regulation of SIRT1 was globally enhancer of the silencing of DNMT1 on tumor suppressor genes (Peng et al., 2011). SIRT1 deacetylates several sites of the tumor suppressor gene product p53, *e.g.*, K320, K372 and K382 which are selectively acetylated by PCAF and p300 under stress conditions and leading to cell cycle arrest or apoptosis (Xenaki et al., 2008).

SIRT1 can not only interact with endogenous protein but also exogenous such as the viral protein Tat. Indeed, it was observed that the HIV protein Tat and SIRT1 can associate to form a complex resulting in an enhanced transcriptional activity of the viral protein (Pagans et al., 2005). By such a mechanism SIRT1 plays a role in the HIV replication.

Altogether, these studies support the notion that SIRT1 is a hub protein orchestrating the molecular events leading to gene silencing via closed chromatin and that the permanent presence of SIRT1 may further maintain the silencing state. The aim of the present study was to identify the complex to which SIRT1 belongs and thus to bring new insights in deciphering the role of SIRT1 in the maintenance of the silenced chromatin state. Here we described this macro-molecular complex and found that it contains the proliferative marker Ki67, POLIII and the transcription factor TFIIC. RNA polymerase III is a polymerase that transcribes SINES (Short Interspersed Elements). SINES are members of the retro-element family, meaning that they replicate through an RNA intermediate. SINES contain an internal RNA polymerase III promoter which allows them to be transcribed, generating RNA molecules which are retrotranscribed and integrated back into the host cell genome thanks to a reverse transcriptase/nuclease encoded by a LINE (Long Interspersed Element) (Weiner, 2002).

Results

Isolation of the SIRT1 complex and identification of specific partners

We used the double-immunoaffinity purification method (Tagami et al., 2004; Ouararhni et al., 2006), which has been used successfully to identify interactive partners of tagged proteins in mammalian cells. For instance, it was found that HIRA belongs to H3.3-con(Tagami et al., 2004)taining complex by using this method (Tagami et al., 2004) and we could demonstrate that the death-associated protein DAXX is a novel chaperone involved in the replication-independent deposition of the histone variant H3.3 (Drané et al., 2010). SIRT1 was stably expressed as a fusion protein with C-terminal Flag- and HA-epitope tags in Mef cells (Fig. 1A). Epitope-tagged SIRT1 complex was then purified from soluble nuclear extracts (SNC) and from chromatin associated extracts (CAC) by sequential immunoprecipitations with anti-Flag antibody followed by anti-HA antibody (Ouararhni et al., 2006). Proteins associated with SIRT1 were separated by SDS-containing 4%-12% polyacrilamide gradient gels and subsequently silver-stained (Fig.1B.1). Mass spectrometry and immunoblotting analyses allowed the identification of the following partners as components common to the SIRT1 complex (Fig. 1B.2), some of which are listed here: TFIIC90, TFIIC220, TFIIC110 TFIIC 102, TFIIC63 (transcription factors of PolIII), NPM1, RPL11, TCF3 (proteins involved in transcription), JunB, JunD, FOS-L2, neurofibromin 2 (proteins involved in cell proliferation). Surprisingly, we found that the proliferation marker Ki-67 belongs to the SIRT1 complex too. To confirm that SIRT1 is a component common of the TFIIC90 complex, we constructed an epitope-tagged TFIIC90 fusion protein (e-TFIIC90), which was purified with the double-immunoaffinity purification method. Figure 1C shows that SIRT1, TFIIC220, TFIIC110, TFIIC102, TFIIC63 and Ki67 co-purified with TFIIC90. To further assess whether all these components constitute a single macro-molecular complex or rather they are forming multiples complexes, the SIRT1 complex was subjected to purification on glycerol gradients (15%-35%). The most abundant SIRT1 fractions were fractions 3 & 4 (Fig. 2). Immunoblotting experiments showed similar patterns for SIRT1, Ki67, TFIIC90 and TFIIC220, supporting the existence of a single macro-molecular complex including these components.

SIRT1 is involved in the regulation of B1 & B2 SINEs and LINE transcription

TFIIIC90 and TFIIIC220 are essential transcription factors for the PolIII type II promoter activation (Paule and White, 2000, Schramm and Hernandez, 2002). B1 and B2 SINEs contain such a promoter and as such are transcribed by PolIII. B1 SINEs have a consensus sequence of approximately 135 nucleotides and are derived from 7SL RNA whereas B2 SINEs have a consensus sequence of 209 nucleotides and are derived from tRNA. LINEs are also transcribed by the PolIII machinery. Considering that we found SIRT1 and different subunits of the TFIIIC complex, we hypothesized that SIRT1 can be involved in the transcription of SINEs and LINE. Levels of mRNA for B1, B2 SINEs and LINE were determined by reverse transcription PCR in Mef cells (Fig. 3A). Mef *sirt1*^{-/-} cells showed significant higher levels of B1 & B2 SINEs and LINE when compared with Mef wild-type cells (Fig. 3A). Unsurprisingly, the rescue of SIRT1 expression allowed come back to mRNA levels comparable to those observed with the wild-type. So far these results show that SIRT1 is involved in the regulation of SINEs and LINE transcription but do not allow to discriminate if it is mediated by the enzymatic activity or by its interaction with other components of the SIRT1 complex. For this we constructed a mutant targeting the enzymatic domain of SIRT1, more precisely at amino acid 363. This mutation drastically increased the expression of B1 & B2 SINEs and LINEs (Fig. 3A). Furthermore, we could observe that a PolIII inhibitor decreased the levels B1 & B2 and LINE mRNA in Mef wild-type cells as well as in Mef *sirt1*^{-/-} cells.

We next wanted to check whether SIRT1 plays a role, *in vivo*, in the regulation of the transcription of SINEs and LINE, we looked at their expression in transgenic *sirt1*^{-/-} mice. Figure 4 shows B1 & B2 SINEs and LINE mRNA levels in mouse embryos, mouse liver and small intestine at day 0, day 7 and day 12 after birth. In mouse embryos, *sirt1*^{-/-} mice show drastic increase of B1 & B2 SINEs and LINE transcription when compared with wild-type mice. However, after birth a variability of the contribution of SIRT1 on the regulation of B1 & B2 SINEs and LINE transcription can be observed according to the time and according to the tissue investigated. Indeed, in mouse liver the increase in B1 transcription was increased from day 0 to day 12 whereas for B2 the level was notably increased at day7 till day 12. LINE sequences transcription was first enhanced at day 0, but augmentation was less evident at day D7 and even was decreased at day12. In mouse small intestine, transcriptions of B1 and B2 SINEs followed a similar pattern as increases were detectable only day 7 and day 12. Concerning LINE, a significant enhancement of transcription in mouse *sirt1*^{-/-} could be

detected only at day 7. These results show that, in vivo, SIRT1 plays a complex role in the regulation of the transcription of repeated DNA sequences.

The consequence of the transcription of B1 & B2 SINEs and LINE on the ATP consumption was analyzed. Figure 5 shows that the ATP /ADP ratio in Mef sirt1^{-/-} is enhanced when compared with Mef wild-type cells. This increase was abolished by Mef sirt1 rescuing but not by the mutant sirt1 H363Y. These results clearly show that the absence of SIRT1 leads to an aberrant ATP consumption as a result of increase repeated DNA sequences transcription.

SIRT1 dictates the Ki67 tethering to the chromatin

To gain insight into the relationship between SIRT1 and its partners, particularly Ki67, we looked at the proteins that are co-purified using the epitope tagged TFIIC90 in Mef sirt1 wild-type and Mef sirt1^{-/-} cells (Fig. 6). Epitope-tagged TFIIC90 complex was then purified from chromatin associated extracts (CAC) in Mef sirt1 wild-type and Mef sirt1^{-/-} by sequential immunoprecipitations with anti-Flag antibody followed by anti-HA antibody. The co-immunoprecipitated proteins with TFIIC90 show some differences between wild-type and with sirt1^{-/-} cells (Fig. 6A). Some of the proteins that co-immunoprecipitate with TFIIC90 in both cell lines are listed in Fig. 6B. It is noteworthy to observe that in Mef sirt1^{-/-}, Ki67 was not detected in contrast to DAXX, PCAF and the histone variant H3.3. In Mef sirt1 wild type global acetylation was merely undetectable, conversely Mef sirt1^{-/-} cells global acetylation was drastically enhanced suggesting that SIRT1 is the major HDAC that regulates the acetylation status of its partners. However, this experiment was not sufficient to determine whether it is the SIRT1 deacetylase activity that is required to trap Ki67. To investigate this possibility we constructed an epitope-tagged SIRT1 that was mutated in the catalytic enzymatic site (H363Y). SIRT1 mutated complexes were then purified from soluble nuclear extracts (SNC) and from chromatin associated extracts (CAC) by sequential immunoprecipitations with anti-Flag antibody followed by anti-HA antibody. The data illustrated in Fig. 6C showed that the mutation was effective in that global acetylation of the SIRT1 complex was increased. Furthermore, we observed that in both SNC and CAC, Ki67 still co-immunoprecipitate with the SIRT1 mutant, thus demonstrating that the SIRT1-dependent recruitment of Ki67 to the chromatin is not dependent upon the HDAC enzymatic activity of SIRT1.

SIRT1 and Ki67 are interdependent during proliferation

We then wished to determine the importance of the relationship between SIRT1, Ki67 and the transcription of SINEs and LINE. For this we used C2C12 cells, which are muscle cells that easily differentiate in the absence of fetal calf serum. In proliferating conditions, C2C12 cells display high expression of SIRT1 and Ki67. When these cells underwent differentiation, the expression of SIRT1 fell down and that of Ki67 disappeared (Fig. 7A). The consequence of cell differentiation, was an increase in the transcription of B1 & B2 SINEs and LINE (Fig. 7A). Interestingly, down-regulating Ki67 with shRNA led to a decrease in the amount of SIRT1, hence we can propose that Ki67 down-regulation mimics cell differentiation, in terms of SIRT1 expression and B1 & B2 and LINE transcription.

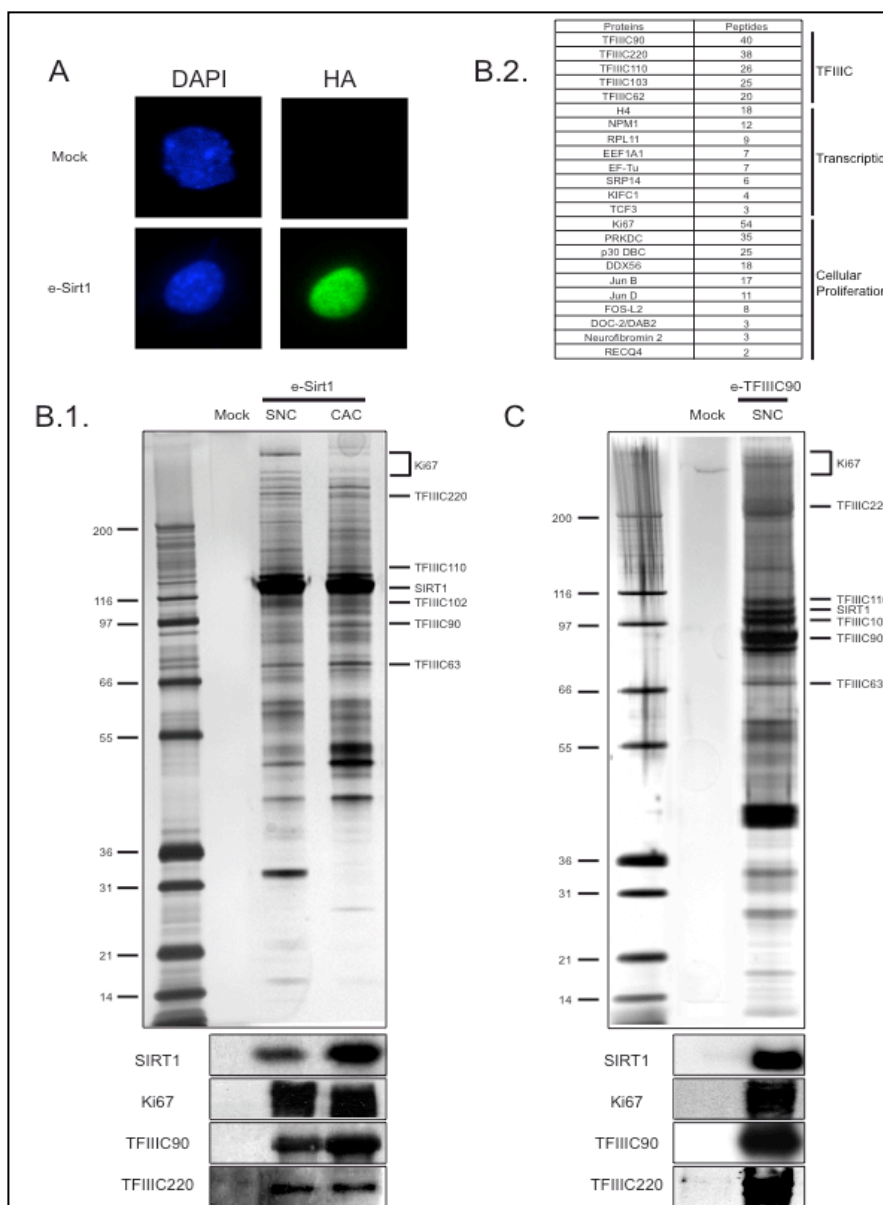


Figure 1. Immunopurification of e-SIRT1 from Soluble Nuclear and Chromatin-Anchored fractions.

(A) Stable expression of e-SIRT1 in Mouse Embryonic Fibroblasts (Mef) cells. Cells expressing e-SIRT1 and control cells (Mock) were stained with anti-HA (left) and DAPI (right). Mock represents a non tagged Mef cell line. **(B1)** Silver staining of proteins associated with e-SIRT1 complex in Soluble Nuclear Extract (SNC) and Chromatin Anchored Extract (CAC). The complexes containing e-SIRT1 were purified by double immunoaffinity from Mef cells. The lane Mock represents to a mock purification from a non tagged Mef cell line. Polypeptides identified by mass spectrometry analysis and the positions of molecular size markers (Mark Molecular Weight, MWM, Invitrogen) are indicated. **(B2)** Western Blot analysis of e-SIRT1 SNC and CAC. e-SIRT1.com were run on a 8% SDS PAGE gel and after transfer, the blot was revealed with the indicated antibodies. **(C)** Polypeptides identified by mass spectrometry analysis. Polypeptides associated with e-SIRT1 SNC were determined by mass spectrometry analysis. The table shows major proteins and the number of peptides interacting with e-SIRT1 SNC. **(D1)** Silver staining of proteins associated with e-TFIIIC90 in SNC. Experiments were performed as described in B1. **(D2)** Western Blot analysis of e-TFIIIC90 SNC. Experiment was run as described in B2.

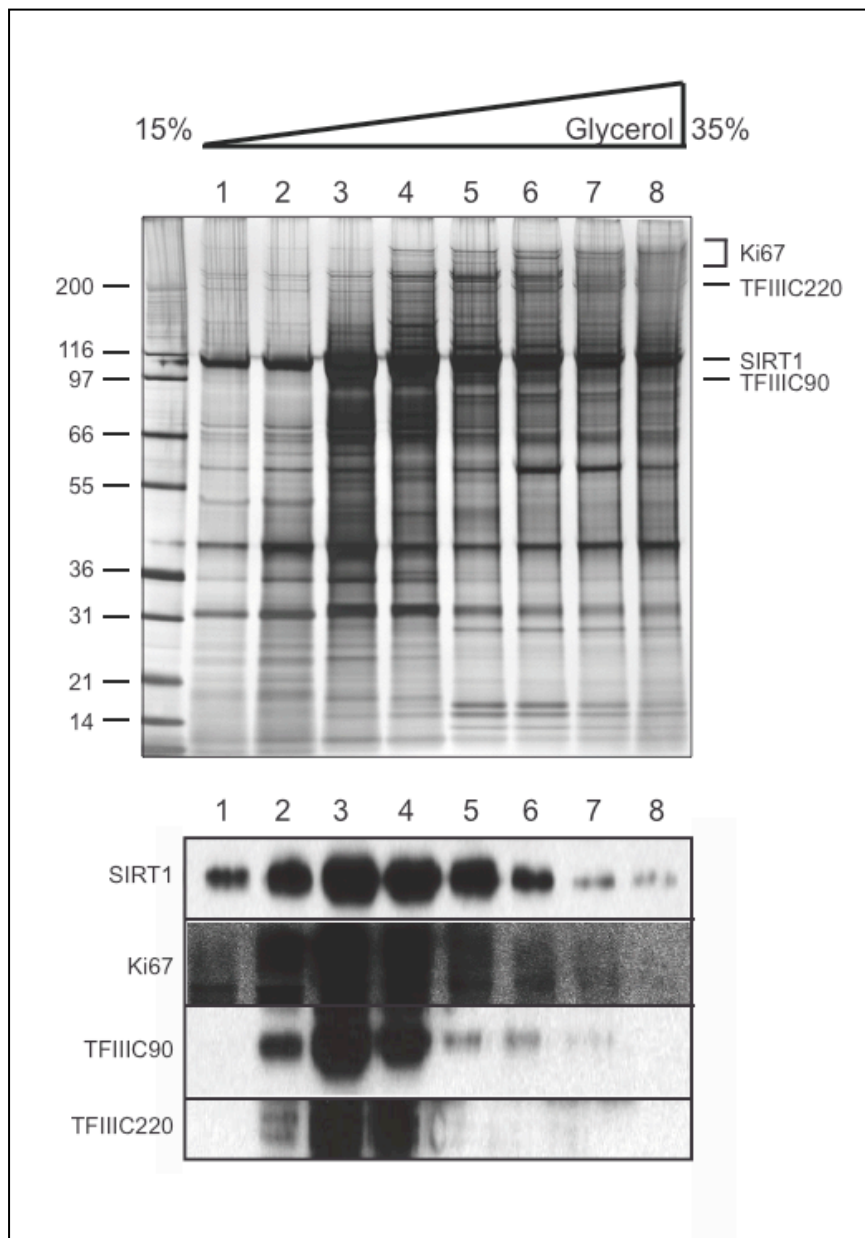


Figure 2. Ki67, TFIIIC, and SIRT1 are stably associated in the same e-SIRT1 subcomplexes.

(A) Silver staining of the e-SIRT1 SNC fractionated on a glycerol gradient. The e-SIRT1 SNC purified by double affinity was separated on a 15-35% glycerol gradient. Eight fractions were pooled as indicated at the top of the gel. The approximate molecular weight of the different subcomplexes was estimated using MWM. **(B)** Immunoblotting of pooled fractions containing e-SIRT1 subcomplexes with the indicated antibodies. e-SIRT1 subcomplexes were run on a 8% SDS PAGE gel and after transfer, the blot was revealed with the indicated antibodies.

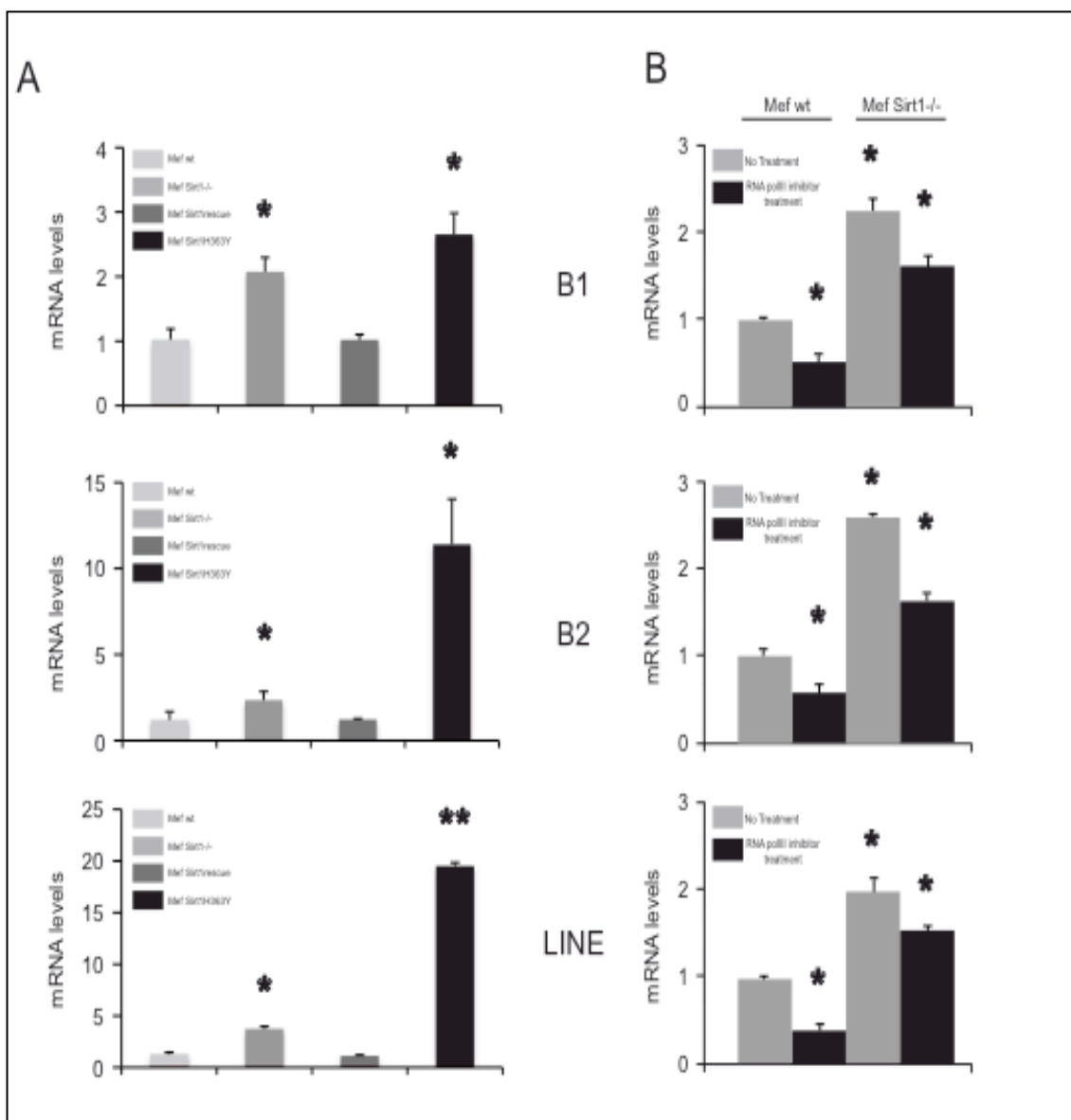


Figure 3. SIRT1 is required for SINEs and LINEs transcription regulation in Mef cells. (A) Depletion of Sirt1 or depletion of Sirt1 deacetylase function resulted in an increase of SINEs and LINEs transcription levels. Relative mRNA expression levels of SINEs (B1, B2) and LINEs were measured by real time quantitative PCR (RT-qPCR) in a wild-type Mef cell line (Mef wt), in a Sirt1 depleted Mef cell line (Mef Sirt1^{-/-}), in a Sirt1 rescue Mef cell line (Mef Sirt1^{rescue}), and in a Sirt1 non functional mutant cell line (Mef SIRT1H363Y). Data represent mRNA levels relative to HPRT and are given as means \pm s.d., n=3. (B) SINEs and LINEs are transcribed by RNA polymerase III. Relative mRNA expression levels of SINEs and LINEs were measured by RT-qPCR in wild type Mef cell line treated or not with specific RNA polymerase III inhibitor. Data represent mRNA levels relative to HPRT and are given as means \pm s.d., n=3.

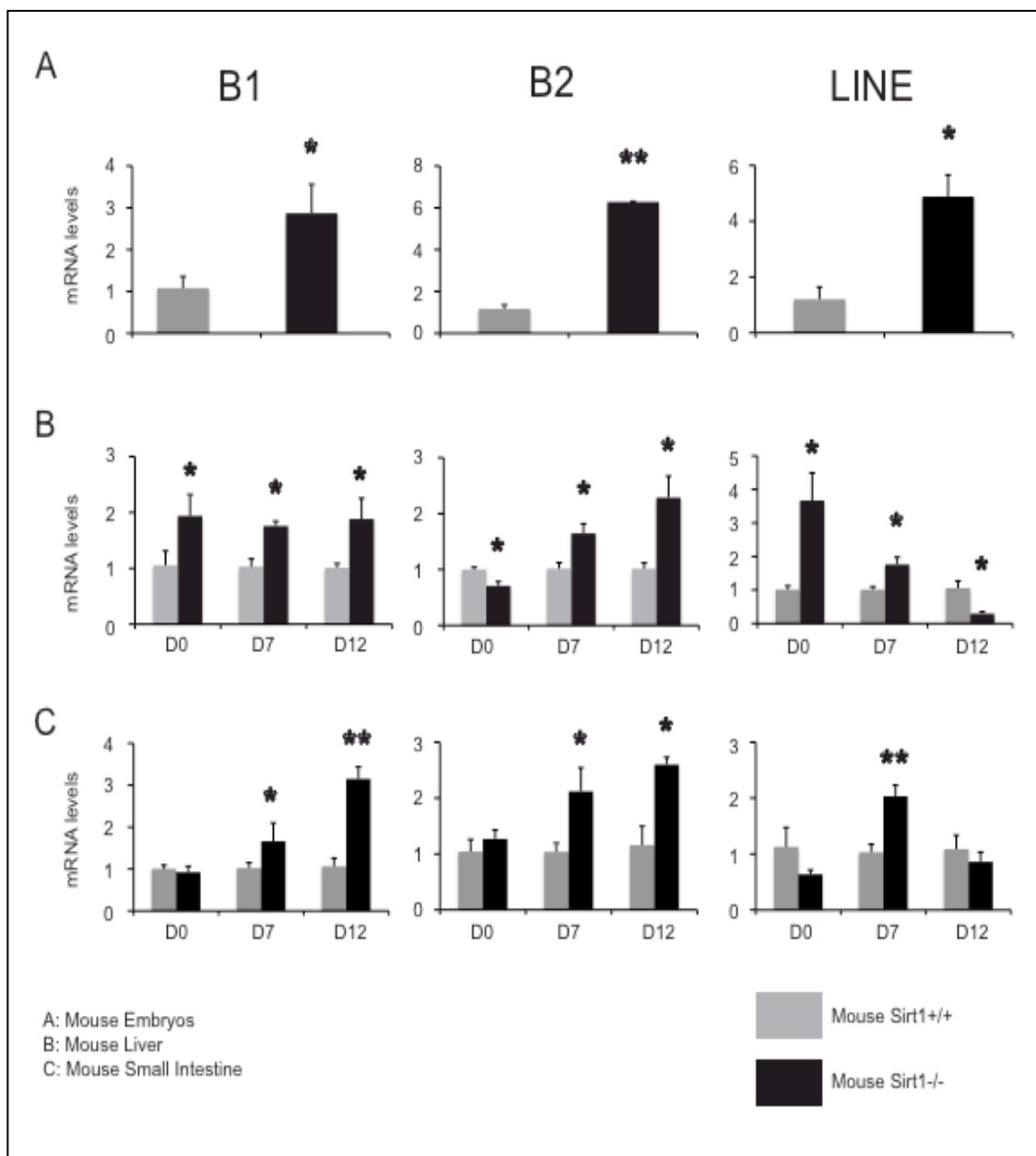


Figure 4. SIRT1 is required for SINES and LINES transcription regulation in Mouse. (A) Homozygous depletion of Sirt1 resulted in an increase of SINES and LINES transcription levels. Relative mRNA expression levels of SINES (B1, B2) and LINES were measured by RT-qPCR of three-weeks mouse embryos depleted (Mouse Sirt1^{-/-}) or not (Mouse Sirt1^{+/+}) of SIRT1. Sirt1^{-/-} mouse embryos were obtained according to the technique of homologous recombination. Data represent mRNA levels relative to HPRT and are given as means \pm s.d., n=3. (B, C) Homozygous depletion of Sirt1 resulted in an increase of SINES and LINES transcription levels of mice liver (B) and small intestine (C). Relative mRNA expression levels of SINES (B1, B2) and LINES were measured by RT-qPCR in liver and small intestine of mice depleted (Mouse Sirt1^{-/-}) or not (Mouse Sirt1^{+/+}) of Sirt1. Liver and Small intestine were removed from mice at birth (D0), seven days after birth (D7) or thirteen days after birth (D13). Sirt1^{-/-} mice were obtained according to the technique of homologous recombination. Data represent mRNA levels relative to HPRT and are given as means \pm s.d., n=3.

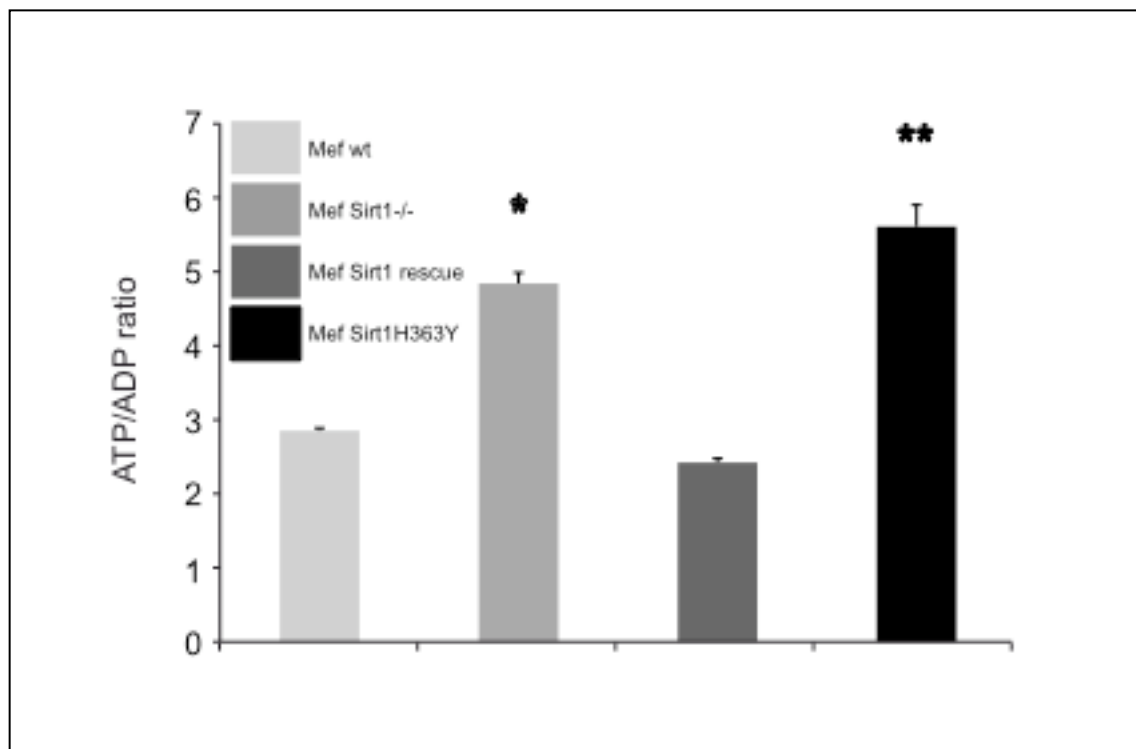


Figure 5. Depletion of Sirt1 is correlated with an increase of energetic expenditure. ATP/ADP ratio was measured with ApoSENSOR™ ADP/ATP Ratio Assay Kit biovision, in Mef wt, Mef Sirt1^{-/-}, Mef Sirt1 rescue, and Mef Sirt1H363Y cell lines (n=3).

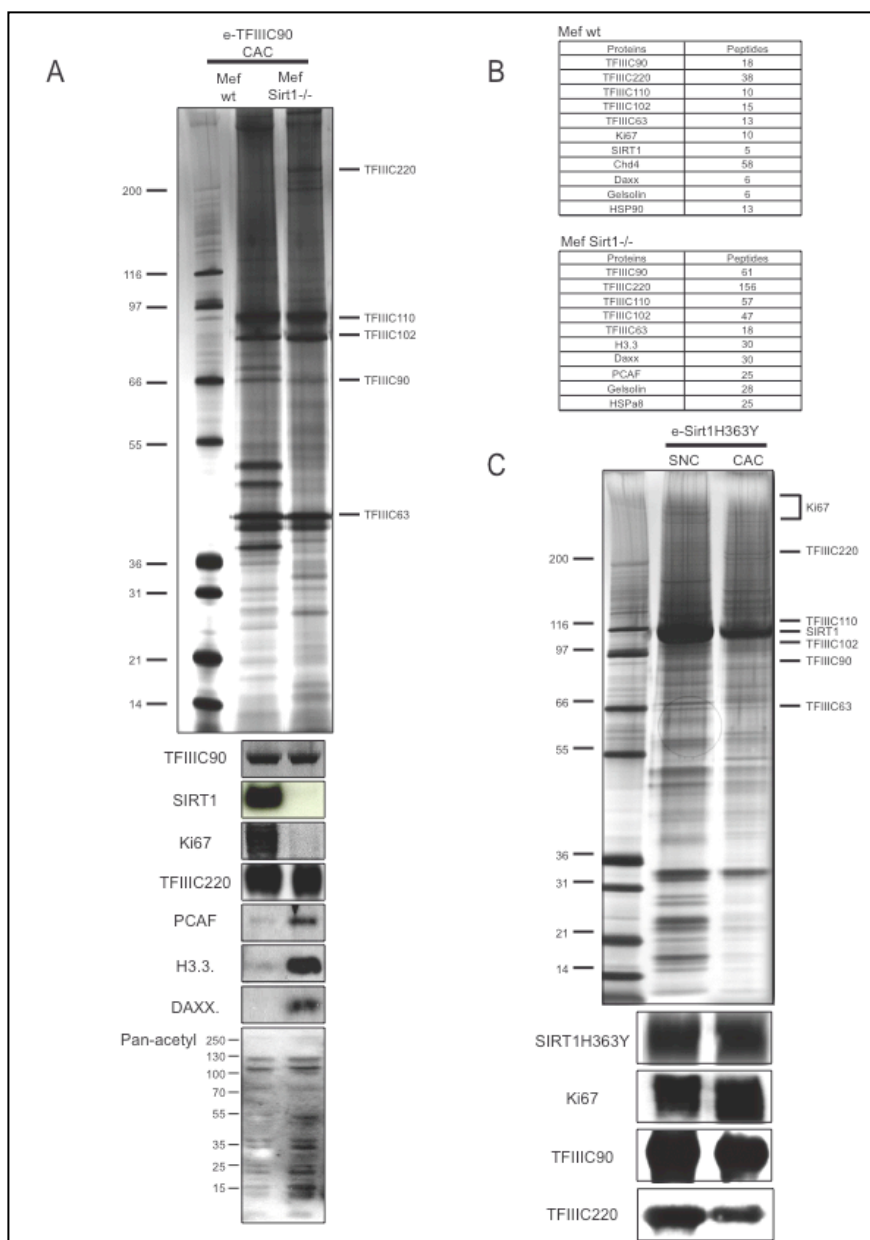


Figure 6. Immunopurification of e-TFIIC90 from Chromatin-Anchored fractions of wild-type and Sirt1^{-/-} Mef cell lines.

(A1) Silver staining of proteins associated with e-TFIIC90 complexes in CAC of Mef wt and Mef Sirt1^{-/-} cell lines. The complexes containing e-TFIIC90 were purified by double immunoaffinity from Mef cells. Polypeptides identified by mass spectrometry analysis and the positions of molecular size markers (Mark Molecular Weight, MWM, Invitrogen) are indicated. **(A2)** Western Blot analysis of e-TFIIC90 CAC in Mef wt and Mef Sirt1^{-/-} cell lines. e-TFIIC90.com were run on a 8% SDS PAGE gel and after transfer, the blot was revealed with the indicated antibodies. **(B)** Polypeptides identified by mass spectrometry analysis. Polypeptides associated with e-TFIIC90 CAC, in Mef wt and Mef Sirt1^{-/-} cell lines, were determined by mass spectrometry analysis. The table shows major proteins and the number of peptides interacting with e-TFIIC90 CAC. **(D1)** Silver staining of proteins associated with e-SIRT1H363Y complexes in SNC and CAC. The experiments were performed as described in A1. **(D2)** Western Blot analysis of e-SIRT1H363Y SNC and CAC. The experiment was run as described in A2.

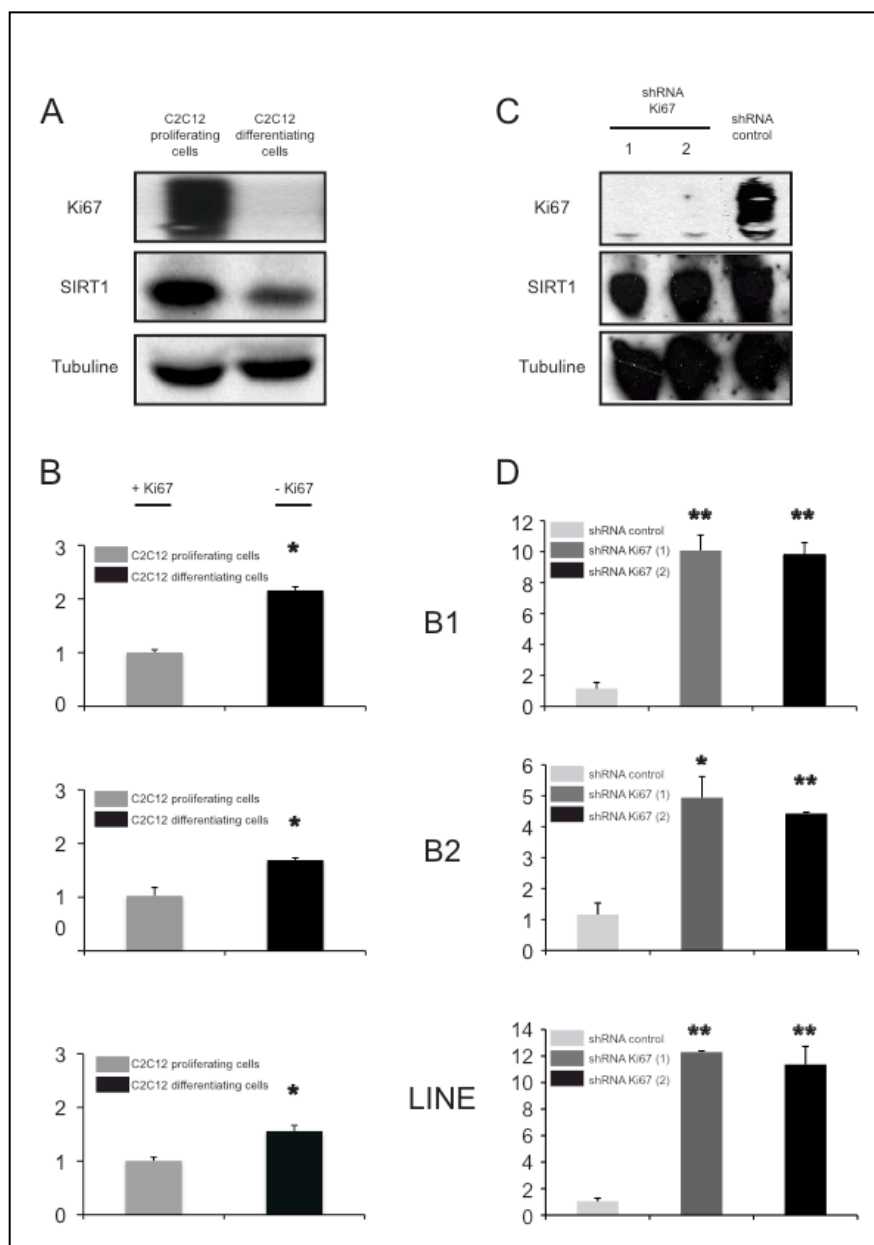
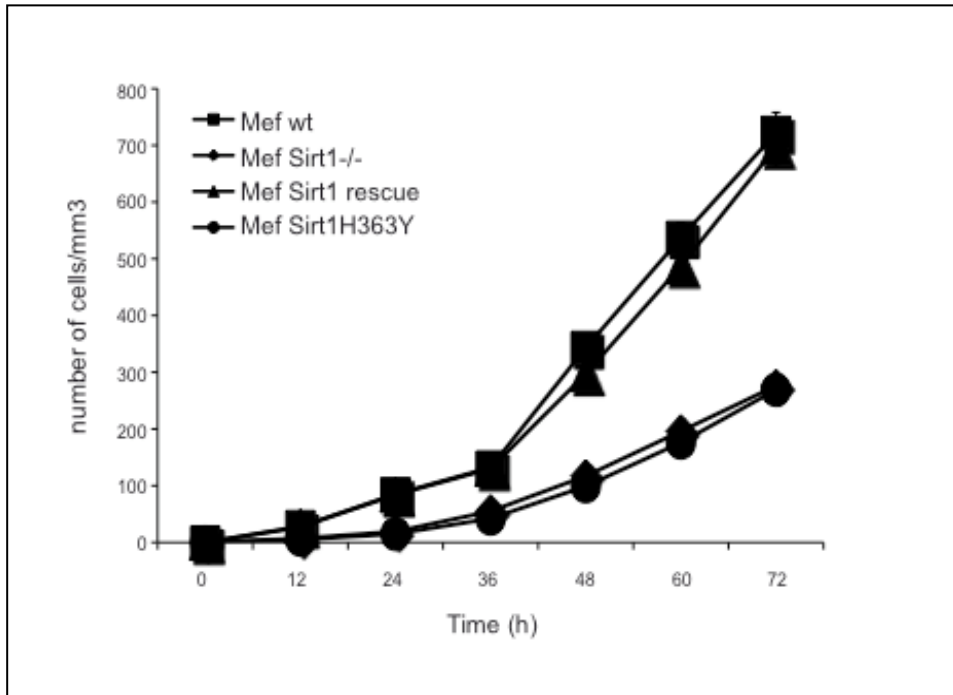


Figure 7. Ki67 is required for SINEs and LINEs transcription regulation in C2C12 and Mef cell lines.

(A) Ki67 is not expressed in differentiating C2C12 cells. Western Blot analysis of C2C12 proliferating or differentiating cells. Total extract of these cells were run on a 8% SDS PAGE gel and after transfer, the blot was revealed with the indicated antibodies. (B) The non-expression of Ki67 resulted in an increase of SINEs and LINEs transcription levels. Relative mRNA expression levels of SINEs (B1, B2) and LINEs were measured by real time quantitative PCR (RT-qPCR) in C2C12 proliferating cells and in C2C12 differentiating cells. Data represent mRNA levels relative to HPRT and are given as means \pm s.d., n=3. (C) Determination of the efficiency of Specific Ki67 shRNA. Western Blot analysis in wild type Mef cell line. The experiment was performed as described in A. (D) The inhibition of Ki67 expression resulted in an increase of SINEs and LINEs transcription levels. Relative mRNA expression levels of SINEs (B1, B2) and LINEs were measured by real time quantitative PCR (RT-qPCR) in wild type Mef cells using or not specific Ki67 shRNA. Data represent mRNA levels relative to HPRT and are given as means \pm s.d., n=3.



Supplemental Figure. Sirt1 is required for cellular proliferation regulation.

Proliferation test was performed in Mef wt, in Mef Sirt1^{-/-}, in Mef Sirt1rescue, and in Mef SIRT1H363Y cell lines during 72 hours. Cells were removed every 12 hours and counted using a Malassez Cell every 12 hours. Data represent number of cells by mm³ (n=3).

Discussion

Except the work of Vaquero et al., which first demonstrated a direct interaction of SIRT1 with binding histone H1 (Vaquero et al., 2004), knowledge's on the SIRT1-interacting protein network is fully missing. Nevertheless, several proteins have been identified as substrates for SIRT1. SIRT1 is currently associated with gene repression via histone H3 (Sun et al., 2007; Kume et al., 2010), H4 and H1 (Vaquero et al., 2004), the control of glucidic metabolism with PGC1- α (Rodgers et al., 2005; Lagouge et al., 2006), FOXO1 (Rodgers and Puigserver, 2007), PT1B (Sun et al., 2007), and UCP2 (Bordone et al., 2006), the control of lipid metabolism with nuclear receptors PPAR γ (Picard et al., 2004), and LXR (Li et al., 2007), to neuroprotection via NF- κ B (Chen et al., 2005), to apoptosis with the transcription factor p53 (Cheng et al., 2003), FOXO3a (Brunet et al., 2004), NF-kappa B (Yeung et al., 2004), in DNA repair by the intermediate repair factor Ku70 (Cohen et al., 2004). Consequently, we projected to isolate for the first time the SIRT1 complex. Thanks to the method of double-immunoaffinity purification to identify partners interacting with tagged proteins in mammalian cells (Tagami et al., 2004; Ouararhni et al., 2006), we extracted the SIRT1 complex from a nuclear fraction (SNC) and a fraction anchored to chromatin (CAC) of mouse Mef (Figure 1.B1). We were able to demonstrate the involvement of SIRT1 in a new regulatory pathway leading to the control of the transcription machinery of RNA polymerase III, and that of cell proliferation.

TFIIIC, a major partner of SIRT1

Mass spectrometry, and immunoblotting analyses of soluble nuclear complex (SNC) were able to identify the protein partners associated with SIRT1. SIRT1 is the center of a complex combination with transcription factors (TFIIIC, NPM1, RPL11, TCF3) and factors associated with cell proliferation (Ki67, JunB, JunD, FOS-L2, neurofibromin 2). Highly interesting and new, SIRT1 has a favorite partner, namely TFIIIC, including the subunits TFIIIC90, TFIIIC220, TFIIIC110, TFIIIC102 and TFIIIC63, a major actor in the transcription machinery of RNA polymerase III.

The transcription factor TFIIIC is, in turn, at the basis of the formation of the pre-initiation complex of RNA polymerase III transcription machinery. SIRT1 complex contains all the subunits comprising the transcription factor TFIIIC, namely, the five subunits TFIIIC90, TFIIIC220, TFIIIC110, and TFIIIC102 TFIIIC63. These subunits are essential for

the recognition of PolIII type 2 promoters, by binding to boxes A and B boxes located upstream of the initiation transcription site (Marzouki et al., 1986; Deprez et al., 1999; Ducrot et al., 2006). This binding leads to recruitment of the transcription factor TFIIB (Mylona et al., 2006) and consecutively the incorporation of RNA polymerase III at these promoters, allowing PolIII transcription initiation. This result shows that the SIRT1 complex contains all the transcription factors necessary to recruit the PolIII to the corresponding promoters and suggest that SIRT1 is indispensable for this recruitment.

SIRT1, Ki67, and TFIIC form a protein network

Unexpectedly, we also found the nuclear protein Ki67 in the SIRT1 complex. When purifying and analyzing the TFIIC90 complex, in the same manner as SIRT1, we confirmed that SIRT1 and Ki67 are components common to TFIIC90, and subunit TFIIC in general (Figure 1C). By fractioning with a glycerol gradient (15-35%) and analysis of fractions by western blotting, we found that SIRT1, TFIIC, and Ki67 form a single macromolecular complex, suggesting the possibility of a complementary role of these three partners (Figure 2).

The nuclear protein Ki67 is expressed exclusively in proliferating cells (Gerdes et al., 1984) during the active phases of the cell cycle (G1, S, G2, and mitosis) and its expression is completely absent in G0 cells, although low levels of this protein can be detected in quiescent cells (Bullwinkel et al., 2006). Because, in histopathology, the fraction of positive tumor cells nuclei correlates well with the prognosis of a variety of cancers, antibodies against Ki67 are widely used in routine diagnosis of tumors (Scholzen and Gerdes, 2000; Brown and Gatter, 2002). Moreover, some papers suggest that Ki67 could also be a promising target in tumor therapy (Kausch et al., 2003; 2004) but overall the cellular function of this protein remains elusive.

However, some studies have suggested the involvement of Ki67 in the inhibition of ribosomal RNA synthesis by RNA polymerase I *in vivo*, although this mechanism of inhibition is still unclear (Bullwinkel et al., 2006; Rahmanzadeh et al., 2007). Indeed, the authors proposed that this effect is due to a direct functional inactivation of Ki67, or inhibition of a member of the PolI transcription machinery in the vicinity of the initiation site. Nevertheless, the availability of ribosomal RNA molecules is a key regulator for ribosome production, and therefore determines the potential for cell growth and proliferation. The identification of this function is the first evidence of the involvement of Ki67 in a transcription mechanism. In contrast, we propose that the inhibitory effect on ribosomal

transcription of Ki67 is mediated via an action on PolIII and that this effect is governed by the activity of SIRT1.

This is supported by our further investigations. TFIIC90 and 220 transcription factors are essential for PolIII type II promoters activation . Most class III genes, including tRNA, VA RNAs, Alu sequences, 7SL RNA, the 5'UTR of LINE-L1, the SINES B1 and B2 are under the dependence of type 2 promoters composed by intragenic A and B boxes, targets of TFIIC (Dieci et al., 2007; CantÃ³ and Auwerx, 2009). Considering that SIRT1 and TFIIC are embedded in the same complex, we hypothesized that SIRT1 affects the expression of some of these genes. Interestingly, the RT-qPCR experiments *in vitro* on Mef (Figure 3A) and *ex vivo* on total embryos and organs (Liver and Small Intestine) mice (Figure 4) demonstrated that in the absence of SIRT1 or in the presence of mutant or nonfunctional SIRT1 (SIRT1H363Y), the level of transcript expression of PolIII SINES especially B1, B2 and part of 5'UTR LINES is drastically affected. Indeed, these sequences are abnormally transcribed when SIRT1 can no longer play its role, suggesting a role as a PolIII transcriptional repressor. Furthermore, the use of an inhibitor of PolIII in wild-type Mef cells and in *sirt1*^{-/-} Mef cells decreased levels of expression of these genes, allowing us to further confirm that these transcripts are due to an enhanced activity of PolIII, and that this effect is dependent upon the activity SIRT1.

The increase in the expression level of SINES and LINES causes abnormal consumption of ATP

SIRT1 is known to regulate energy metabolism, namely ATP consumption (Boily et al., 2008; CantÃ³ and Auwerx, 2009). Thus, we hypothesized that PolIII transcription machinery dysregulation can affect energy metabolism by targeting the ATP/ADP ratio. For this, we evaluated the consequences of LINES-L1, SINES B1 and B2 transcripts upregulation on the consumption of ATP by measuring the ratio ATP / ADP. Interestingly, we observed that the SIRT1 depletion and deacetylation function disappearing disrupt the ATP / ADP ratio in the same way that the transcription level of PolIII transcripts, since its absence led to an aberrant consumption of ATP whereas the cells produce less ATP. Overexpression of these repeated DNA sequences has a consequence on energetic metabolism (Figure 5). *sirt1*^{-/-} mice are hypermetabolic but lethargic, with an inefficient ATP production by the mitochondria, suggesting that energy production system may be defective (Boily et al., 2008). We suggest that this inefficient ATP production and the *sirt1*^{-/-} hypermetabolic phenotype is a consequence of aberrant LINES and SINES transcription.

SIRT1 dictates the anchoring of Ki67 to the chromatin

To better understand the relationship between SIRT1 and its partners, and the effect of histone deacetylase on the composition of the PolIII transcriptional machinery, we thought to purify TFIIC90 complexes in Wild-type Mef cells and in *sirt1*^{-/-} Mef cells and analyze them by mass spectrometry. So very interestingly, we have seen many changes in the composition of TFIIC90 complex. Indeed, first, the absence of SIRT1 leads to Ki67 loss suggesting a strong interaction between these two partners. Furthermore, we observed the recruitment of many active chromatin marks, through the H3.3. histone variant, its chromatin deposition chaperone Daxx (Drane et al., 2010), and histone acetyl-transferase PCAF (Muth et al., 2001). Finally, the acetylation status of TFIIC90 complex in *sirt1*^{-/-} Mef cells increases drastically, compared with wild-type Mef cells. Much evidence showing that SIRT1 is a transcriptional PolIII transcription repressor. Considering that the absence of SIRT1, accompanied by a loss of chromatin associated Ki67 favors the recruitment of epigenetic factors for active gene transcription, we suggest that Ki67 acts as a coordinated manner with SIRT1-dependent PolIII transcription machinery repression (Figure 5A, 5B).

But so far our study did not allow us to conclude on the need of SIRT1 to be deacetylated to trap Ki67. For this, we conducted a SIRT1 construct with an epitope carrying H363Y mutation inactivating the function of Sirt1 deacetylase and purify the Soluble Nuclear Complex (SNC) and Chromatin-Anchored Complex (CAC). We noticed that this mutation is effective in increasing the overall acetylation status of the complex but not in Ki67 recruitment, suggesting that SIRT1-dependent recruitment of Ki67 on chromatin is not dependent of the SIRT1 enzymatic activity, but rather on a physical interaction between the two proteins (Figure 5C).

SIRT1 and Ki67 are interdependent during cell proliferation

To determine the importance of the relationship between Ki67, SIRT1 and PolIII transcription of SINES and LINES, during cell proliferation, we examined SIRT1 and Ki67 expressions in proliferating C2C12 cells, in differentiating C2C12 cells and in Ki67 knocked-down cells (shRNA). Western Blot analysis revealed that SIRT1 and Ki67 expressions decreased as a result of C2C12 cells differentiation into myotubes (Figure 6A, 6C). In addition, absence of Ki67 causes an increase in SINES and LINES transcription. Furthermore, we noticed that cell proliferation decreases in depleted Sirt1 Mef cells, as well as the incorporation of nonfunctional SIRT1 mutant, suggesting an interconnection between SIRT1

absence, Ki67 underexpression, PolIII transcription increasing and under-regulation of cell proliferation. We can therefore conclude that Ki67 is a major player, as well as SIRT1, in PolIII transcription machinery regulation (Figure 6B, 6D).

Concluding remarks

Through all these results, it has been possible to demonstrate that SIRT1 and Ki67 have a role in PolIII transcription repression. These two proteins are interdependent and interact together. Unfortunately, we haven't characterized the type of connection between these two proteins but is under investigation. Our work draws for the first time the basis of a new protein network involving Ki67 and SIRT1 as repressor for PolIII-dependent transcription of repeated DNA sequences. The consequences of repetitive sequences SINES and LINES over-expression remain elusive to date since they have little known functions, although respectively, 13% and 21% of the human genome consist of these repeated sequences. We know, however, that murine B2 RNA can inhibit transcription by binding directly to polIII, and human Alu RNA can modulate protein translation by regulating negatively protein expression through an antisense effect. Most interesting, in humans, the insertion of Alu sequences causes a mutation in the sequence of the LDL receptor (low density lipoprotein, cholesterol transporter). The mutation comes from a deletion between two Alu sequences inserted within the gene. The inclusion of these two Alu sequences causes no phenotype, but recombination between them causes the deletion of the portion of the genome located between them, or exons 16,17 and 18. This mutation causes hypercholesterolemia (Lehrman et al., 1985). In parallel, *sirt1*^{-/-} mice are suffering from metabolic diseases, as a result of SIRT1 metabolic functions loss in regulating triglycerides, glucose and cholesterol levels (Feige and Auwerx, 2008). Therefore, we might imagine that increased LINEs and SINEs transcription via a down-regulation of SIRT1 and/or Ki67 may affect expression of genes involved in metabolism such as those involved in glucose and cholesterol homeostasis.

The present work brings new insights in the understanding of the regulation of metabolic functions of SIRT1, involving cell proliferation factor Ki67, and PolIII transcription machinery during cell growth.

Materials and methods

Cell lines

Mef cells were cultured in DMEM containing 4.5 g/l of glucose, 10% fetal Calf Serum, 1% sodium pyruvate, 1% Pennicilin-Streptomycin. Mef *Sirt1*^{-/-} cells were obtained from Mouse *Sirt1*^{-/-}.

C2C12 cells were obtained from IGBMC, Cell Culture Facility. Under proliferating conditions, C2C12 cells were cultured with DMEM containing 4,5 g/l Glucose, 10% Fetal Calf Serum, 1% Sodium Pyruvate 100mM, 1% pennicilin-streptomycin 100mM. Under differentiating conditions, C2C12 cells were cultured during 72 hours in the presence of the same medium but omitting fetal cal serum.

SIRT1, SIRT1H363Y and TFIIC90 protein fused to N-terminal or C-terminal Flag- and HA-epitope tags (e-SIRT1/e-SIRT1H363Y/e-TFIIC90) were stably expressed in cells by retroviral transduction (Ouararhni et al., 2006).

Antibodies and chemicals

Antibodies employed were as follow: monoclonal antibody Flag M2 (SIGMA); anti-HA 3F10 (Roche); anti-SIRT1 (sc-15404, Santa Cruz Biotechnology); and polyclonal antibody anti-Ki67 (sc-15402, Santa Cruz Biotechnology); anti-TFIIC90 (sc-38539, Santa Cruz Biotechnology); anti-TFIIC220 (sc-23110, Santa Cruz Biotechnology); anti-pCAF (sc-13124, Santa Cruz Biotechnology); anti-DAXX (sc-7152, Santa Cruz Biotechnology); anti-H3.3 (H00003021-M01, Abnova); pan-acetyl (sc-8649, Santa Cruz Biotechnology). The monoclonal anti- β tubulin antibody was engineered in our facility. The cell-permeable indazolo-sulfonamide compound inhibitor of RNA PolIII was obtained from Santa Cruz biotechnology (sc222257).

Recombinant mice

Sirt1^{+/-} mice were obtained from DR. McBurney [21]. *Sirt1*^{-/-} mice were bred for 14–18 backcrosses on a 129/SV background, and were maintained in the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) mouse facility in accordance with the French national animal ethics regulations.

Double-immunoaffinity purification

Mouse SIRT1, and TFIIC90 were PCR amplified by using Vent-polymerase from Mef cells genomic DNA. SIRT1 was mutated using megaprimer PCR procedure to produce SIRT1 H363Y mutant proteins. The complete sequence from each clone was subcloned into the XhoI-NotI sites of the pOZ-N retroviral vector ([Ouararnhi et al. 2006](#)) using standard techniques. e-SIRT1, e-SIRT1H363Y and e-TFIIC90 nuclear complexes (e-SIRT1.com, e-SIRT1H363Y.com and e-TFIIC90.com respectively) were purified by double immunoaffinity as previously described ([Drane et al. 2010](#)).

For glycerol density gradient, samples were loaded onto a 4,5 mL glycerol gradient (15%-35%) and spun 45,000g in a Beckman SW60 rotor for 16h. Fractions were collected from the bottom of the tube.

Mass spectrometry

Identification of proteins was carried out by Taplin Biological Mass Spectrometry Facility (Harvard Medical School, Boston, MA).

Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed using standard procedures. Rat anti-HA antibody (Roche) was used at 1:200 dilution; the secondary antibody used was a goat monoclonal anti-rat IgG coupled to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) at 1:400 dilution. Pictures are taken using the Leica SP2 MP (IGBMC, Microscopy Facility).

shRNA design

ShRNA sequence against, Ki67 (sh-Ki67-1 CTATGTAGCAAAGACATTTAA; shKi67-2 TGGTCTTAGTTCCGTTGATAT), and scramble (CCTAAGGTAAAGGTTAAGTCG) were cloned into pLKO.1(blast) vector (Addgene) for stable suppression of Ki67.

Retrotranscription and real-time quantitative PCR

A 2-ug aliquot of total RNA isolated from three-week wild-type and mutant total embryos, from liver and small intestine of wild-type and mutant mice at birth, seven days, and thirteen days of age (n=3) using TRIZOL reagent was reverse transcribed with Superscript-II kit. A 2-ug aliquot of total RNA isolated from wild-type, Sirt1^{-/-}, Sirt1^{rescue} and Sirt1H363Y Mef cells was reverse transcribed under the same conditions. Real-time quantitative PCR was

done the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche) and the Mastercycler Realplex apparatus (Eppendorf). PCR were performed with the oligonucleotide pairs 5'-GTGGCGCACGCCTTTAATC-3' and 5'-GACAGGGTTTCTCTGTGTAG-3' for *B1*, 5'-GAGATGGCTCAGTGGTTAAG-3' and 5'-CTGTCTTCAGACACTCCAG-3' for *B2*, 5'-AGTGCAGAGTTCTATCAGACCTTC-3' and 5'-AACCTACTTGGTCAGGATGGATG-3' for *LINE* and TGACACTGGCAAAACAATGCA-3' and 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3' for *HPRT*. Samples were run in triplicates and results are normalized to *HPRT*.

ATP/ADP Ratio

ATP/ADP ratio was measured as follow, 10^4 Mef cells per well were cultured in DMEM on 96 well-plates for 24 hours. Prior the assay, medium was removed and 100 μ l of Nucleotide Releasing Buffer for 5 minutes at room temperature with gentle shaking (ApoSENSOR™ ADP/ATP Ratio Assay Kit, Biovision). To measure the ATP levels in the cells, 1 μ l of the ATP Monitoring Enzyme was added into the cell lysate. Luminescence was read during 1 second (Data A). Then, after 1h, luminescence was recorded again (for 1s) (Data B), then 1 μ l of ADP Converting Enzyme was added in each well and luminescence produced was measured for 1s (Data C). Data C-Data B represents ADP levels. Data A represents ATP- Therefore $ATP/ADP \text{ ratio} = (C-B)/A$

Proliferation Test

The number of wild-type, *Sirt1*^{-/-}, *Sirt1* rescue, *Sirt1*H363Y Mef cells was measured as follow, 10^4 Mef cells were cultured in 175 cm³ culture flask containing DMEM for 84 hours. Mef cells were counted using a Malassez cell every 12 hours.

References

- Araki, T., Sasaki, Y., and Milbrandt, J. (2004). Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* *305*, 1010–1013.
- Boily, G., Seifert, E.L., Bevilacqua, L., He, X.H., Sabourin, G., Estey, C., Moffat, C., Crawford, S., Saliba, S., Jardine, K., et al. (2008). SirT1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice. *PLoS ONE* *3*, e1759.
- Bordone, L., Motta, M.C., Picard, F., Robinson, A., Jhala, U.S., Apfeld, J., McDonagh, T., Lemieux, M., McBurney, M., Szilvasi, A., et al. (2006). Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol.* *4*, e31.
- Brown, D.C., and Gatter, K.C. (2002). Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* *40*, 2–11.
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., et al. (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* *303*, 2011–2015.
- Bullwinkel, J., Baron-Lühr, B., Lüdemann, A., Wohlenberg, C., Gerdes, J., and Scholzen, T. (2006). Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell. Physiol.* *206*, 624–635.
- Canto, C., and Auwerx, J. (2009). Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 1–7.
- Chen, Z.Y., Wang, X., Zhou, Y., Offner, G., and Tseng, C.-C. (2005). Destabilization of Krüppel-like factor 4 protein in response to serum stimulation involves the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* *65*, 10394–10400.
- Cheng, H.-L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J.P., Gu, Y., Patel, P., Bronson, R., Appella, E., Alt, F.W., and Chua, K.F. (2003). Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 10794–10799.
- Cohen, H.Y., Lavu, S., Bitterman, K.J., Hekking, B., Imahiyerobo, T.A., Miller, C., Frye, R., Ploegh, H., Kessler, B.M., and Sinclair, D.A. (2004). Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol. Cell* *13*, 627–638.
- Deprez, E., Arrebola, R., Conesa, W., and Sentenac, A. (1999). A subunit of yeast TFIIC participates in the recruitment of TATA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 8042–8051.
- Dieci, G., Fiorino, G., Castelnuovo, M., Teichmann, M., and Pagano, A. (2007). The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends in Genetics* *23*, 614–622.
- Donmez, G., Arun, A., Chung, C.-Y., McLean, P.J., Lindquist, S., and Guarente, L. (2012). SIRT1 protects against α -synuclein aggregation by activating molecular chaperones. *J. Neurosci.* *32*, 124–132.
- Drané, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., and Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-

- independent deposition of H3.3. *Genes & Development* *24*, 1253–1265.
- Ducrot, C., Lefebvre, O., Landrieux, E., Guirouilh-Barbat, J., Sentenac, A., and Acker, J. (2006). Reconstitution of the yeast RNA polymerase III transcription system with all recombinant factors. *J. Biol. Chem.* *281*, 11685–11692.
- Feige, J.N., and Auwerx, J. (2008). Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology. *Current Opinion in Cell Biology* *20*, 303–309.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., and Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* *133*, 1710–1715.
- Houtkooper, R.H., Pirinen, E., and Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 225–238.
- Huhtiniemi, T., Wittekindt, C., Laitinen, T., Leppänen, J., Salminen, A., Poso, A., and Lahtela-Kakkonen, M. (2006). Comparative and pharmacophore model for deacetylase SIRT1. *J. Comput. Aided Mol. Des.* *20*, 589–599.
- Kausch, I., Jiang, H., Brocks, C., and Bruderek, K. (2004). ScienceDirect.com - European Urology - Ki-67-Directed Antisense Therapy in an Orthotopic Renal Cell Carcinoma Model. *European Urology*.
- Kausch, I., Jiang, H., Brocks, C., and Bruderek, K. (2004). *European Urology - Ki-67-Directed Antisense Therapy in an Orthotopic Renal Cell Carcinoma Model. European Urology*.
- Kume, S., Uzu, T., Horiike, K., Chin-Kanasaki, M., Isshiki, K., Araki, S.-I., Sugimoto, T., Haneda, M., Kashiwagi, A., and Koya, D. (2010). Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *J. Clin. Invest.* *120*, 1043–1055.
- Kuzmichev, A., Jenuwein, T., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004). Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol. Cell* *14*, 183–193.
- Kuzmichev, A., Margueron, R., Vaquero, A., Preissner, T.S., Scher, M., Kirmizis, A., Ouyang, X., Brockdorff, N., Abate-Shen, C., Farnham, P., et al. (2005). Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 1859–1864.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes & Development* *16*, 2893–2905.
- Lagouge, M., Argmann, C., and Gerhart-Hines, Z. (2006). Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*.
- Lehrman, M., Schneider, W., Sudhof, T., Brown, M., Goldstein, J., and Russell, D. (1985). Mutation in LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane

and cytoplasmic domains. *Science* 227, 140–146.

Li, X., Zhang, S., Blander, G., Tse, J.G., Krieger, M., and Guarente, L. (2007). SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol. Cell* 28, 91–106.

Marzouki, N., Camier, S., Ruet, A., Moenne, A., and Sentenac, A. (1986). Selective proteolysis defines two DNA binding domains in yeast transcription factor tau. *Nature* 323, 176–178.

Michishita, E., Park, J.Y., Burneskis, J.M., Barrett, J.C., and Horikawa, I. (2005). Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol. Biol. Cell* 16, 4623–4635.

Murr, R., Loizou, J.I., Yang, Y.-G., Cuenin, C., Li, H., Wang, Z.-Q., and Herceg, Z. (2006). Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 8, 91–99.

Muth, V., Nadaud, S., Grummt, I., and Voit, R. (2001). Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription. *Embo J.* 20, 1353–1362.

Mylona, A., Fernández-Tornero, C., Legrand, P., Haupt, M., Sentenac, A., Acker, J., and Müller, C.W. (2006). Structure of tau 60/Delta tau 91 subcomplex of yeast transcription factor IIIC: Insights into preinitiation complex assembly. *Mol. Cell* 24, 221–232.

O'Hagan, H.M., Mohammad, H.P., and Baylin, S.B. (2008). Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS Genet* 4, e1000155.

Ouararhni, K., Hadj-Slimane, R., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Mietton, F., Harel-Bellan, A., Dimitrov, S., and Hamiche, A. (2006). The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity. *Genes & Development* 20, 3324–3336.

Pagans, S., Pedal, A., North, B.J., Kaehlcke, K., Marshall, B.L., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Henklein, P., Frye, R., McBurney, M.W., et al. (2005). SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *PLoS Biol.* 3, e41.

Lirong Peng, Zhigang Yuan, Hongbo Ling, Kenji Fukasawa, Keith Robertson, Nancy Olashaw, John Koomen, Jiandong Chen, William S. Lane and Edward Seto *Mol. Cell. Biol.* 2011, 31(23):4720.

Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Machado De Oliveira, R., Leid, M., McBurney, M.W., and Guarente, L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429, 771–776.

Pruitt, K., Zinn, R.L., Ohm, J.E., McGarvey, K.M., Kang, S.-H.L., Watkins, D.N., Herman, J.G., and Baylin, S.B. (2006). Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet* 2, e40.

Rahmanzadeh, R., Hüttmann, G., Gerdes, J., and Scholzen, T. (2007). Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Prolif.* 40, 422–430.

- Rajendran, R., Garva, R., Krstic-Demonacos, M., and Demonacos, C. (2011). Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription. *J. Biomed. Biotechnol.* *2011*, 368276.
- Ramadori, G., Lee, C.E., Bookout, A.L., Lee, S., Williams, K.W., Anderson, J., Elmquist, J.K., and Coppari, R. (2008). Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability. *J. Neurosci.* *28*, 9989–9996.
- Rodgers, J.T., and Puigserver, P. (2007). Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 12861–12866.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* *434*, 113–118.
- Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., and Horio, Y. (2004). Predominant expression of Sir2 α , an NAD-dependent histone deacetylase, in the embryonic mouse heart and brain. *FEBS Lett.* *556*, 281–286.
- Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* *182*, 311–322.
- Sun, C., Zhang, F., Ge, X., Yan, T., Chen, X., Shi, X., and Zhai, Q. (2007). SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metabolism* *6*, 307–319.
- Sung, J.-Y., Kim, R., Kim, J.-E., and Lee, J. (2010). Balance between SIRT1 and DBC1 expression is lost in breast cancer. *Cancer Sci.* *101*, 1738–1744.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* *116*, 51–61.
- Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004). Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol. Cell* *16*, 93–105.
- Vaquero, A., Sternglanz, R., and Reinberg, D. (2007). NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene* *26*, 5505–5520.
- Weiner, A.M. (2002). SINEs and LINEs: the art of biting the hand that feeds you. *Current Opinion in Cell Biology* *14*, 343–350.
- Xenaki, G., Ontikatzis, T., Rajendran, R., Stratford, I.J., Dive, C., Krstic-Demonacos, M., and Demonacos, C. (2008). PCAF is an HIF-1 α cofactor that regulates p53 transcriptional activity in hypoxia. *Oncogene* *27*, 5785–5796.
- Yang, Y., Fu, W., Chen, J., Olashaw, N., Zhang, X., Nicosia, S.V., Bhalla, K., and Bai, W. (2007). SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1253–1262.
- Yeung, F., Hoberg, J.E., Ramsey, C.S., Keller, M.D., Jones, D.R., Frye, R.A., and Mayo, M.W. (2004). Sirtuin 1 regulates the p53 pathway through acetylation-dependent interactions with MDM2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 12757–12762.

M.W. (2004). Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *Embo J.* 23, 2369–2380.

5. Discussion et perspectives

SIRT1, au centre d'un complexe multiprotéique ?

SIRT1 est une HDAC catalysant l'enlèvement de groupements acétyls au niveau de résidus lysines. SIRT1 agit sur des protéines Histones, induisant une structure condensée de la chromatine, et sur des protéines non-histones, en réprimant leur activité, ce qui en fait dans les deux cas un répresseur transcriptionnel (Houtkooper et al., 2012). De nombreuses protéines ont été identifiées comme étant des substrat de SIRT1. On l'associe de manière courante à la répression génique à travers l'histone H3 (Sun et al., 2007; Kume et al., 2010), H4 et H1 (Vaquero et al., 2004), au contrôle du métabolisme glucidique avec PGC1- α (Rodgers et al., 2005; Lagouge et al., 2006), FoxO1 (Rodgers and Puigserver, 2007), PT1B (Sun et al., 2007), et UCP2 (Bordone et al., 2006), au contrôle du métabolisme lipidique avec les récepteurs nucléaires PPAR γ (Picard et al., 2004), et LXR (Li et al., 2007), à la neuroprotection par l'intermédiaire de NF- κ B (Chen et al., 2005b), à l'apoptose avec les facteurs de transcription p53 (Cheng et al., 2003), FoxO3a (Brunet et al., 2004), NF- κ B (Yeung et al., 2004), et à la réparation de l'ADN par l'intermédiaire du facteur de réparation Ku70 (Cohen et al., 2004a). Cependant, à part Vaquero et al., qui ont pour la première fois mis en évidence une interaction directe de SIRT1 avec l'histone de liaison H1 (Vaquero et al., 2004), aucun travail de caractérisation du complexe associé à SIRT1 n'a pu déterminer son réseau d'interaction protéique. Durant ma thèse, je me suis attaché à comprendre le mécanisme moléculaire par lequel SIRT1 contrôle l'expression de ses gènes cibles en étudiant en détail le réseau protéique interagissant avec l'histone déacétylase SIRT1.

Un outil cellulaire permettant de purifier le complexe protéique associé à SIRT1

La protéomique est aujourd'hui considérée comme l'une des approches "post-génomique" les plus puissantes permettant de comprendre la fonction d'un gène. Ainsi, Nous avons établi une lignée cellulaire murine Mef, exprimant le gène *sirt1* étiqueté en 5' avec les épitopes FLAG et HA. Cette lignée a été obtenue en utilisant une approche rétrovirale pour intégrer une copie ectopique de *sirt1* dans le génome d'une lignée cellulaire Mef. Par immunofluorescence, nous avons montré que la protéine ectopique avait une distribution nucléaire identique à celle de l'endogène. Cet outil cellulaire nous a permis d'expérimenter une méthode de purification par double-immunoaffinité utilisé en routine au laboratoire (Ouararhni et al., 2006) pour identifier les partenaires interagissant avec des protéines

tagguées dans les cellules de mammifères. Nous avons donc extrait le complexe protéique associé à SIRT1 à partir d'une fraction nucléaire soluble (SNC) et d'une fraction ancrée à la chromatine (CAC) des cellules Mef développées au laboratoire.

Ki67, et TFIIC, deux partenaires protéiques privilégiés de SIRT1

La technique de spectrométrie de masse combinée à une analyse par Western Blot du complexe nucléaire soluble (SNC) nous a permis d'identifier les partenaires protéiques associés à SIRT1. Nos résultats montrent que SIRT1 se trouve au centre d'un complexe multiprotéique associant les facteurs de transcription (TFIIC, NPM1, RPL11, TCF3) et les facteurs associés à la prolifération cellulaire (Ki67, JunB, JunD, FOS-L2, Neurofibromine 2). De manière tout à fait intéressante et nouvelle, SIRT1 a comme partenaires protéiques privilégiés Ki67, acteur majeur de la prolifération cellulaire, et TFIIC (TFIIC90, 220, 110, 102, 63), nécessaire pour la mise en place du complexe d'initiation de la machinerie de transcription de la PolIII. L'identification du complexe protéique associé à TFIIC90, purifiée et analysée de la même manière que SIRT1, nous a permis de confirmer que SIRT1 et Ki67 sont des composants communs à TFIIC90, et au facteur de transcription TFIIC d'une manière générale.

Ki67, un marqueur de prolifération cellulaire

La protéine nucléaire Ki67 est exprimé exclusivement dans les cellules en prolifération (Gerdes et al., 1984) durant les phases actives du cycle cellulaire (G1, S, G2, et la Mitose) et son expression est totalement absente des cellules en G0, même si de récentes découvertes ont démontré que de faibles taux de cette protéine peuvent aussi être détectés dans les cellules en quiescence (Bullwinkel et al., 2006). La corrélation stricte de la prolifération cellulaire et de l'expression de Ki67 fait de cette protéine un excellent marqueur pour déterminer la fraction dite en croissance d'une population de cellules données. Dû au fait qu'en histopathologie, la fraction de noyaux de cellules tumorales positives corrèle bien avec le pronostic d'un certain nombre de cancers, les anticorps contre Ki67 sont largement utilisés en routine dans le diagnostic des tumeurs (Scholzen and Gerdes, 2000; Brown and Gatter, 2002). De plus, de récentes publications indiquent que Ki67 est également utilisé comme cible prometteuse dans la thérapie tumorale (Kausch et al., 2003; 2004). Malgré ces applications, la fonction cellulaire de cette protéine demeure incomprise. L'interdépendance

de la prolifération cellulaire et de l'expression de Ki67 suggère tout de même un rôle dans la croissance ou dans la division cellulaire.

TFIIIC, sous-unité nécessaire à l'activité de l'ARN Polymérase III

Le facteur de transcription TFIIIC est, quant à lui, à la base de la formation du complexe de pré-initiation de la machinerie de transcription de la PolIII. SIRT1 contient dans son complexe toutes les sous-unités composant le facteur de transcription TFIIIC, à savoir, les 5 sous-unités TFIIIC90, TFIIIC220, TFIIIC110, TFIIIC102 et TFIIIC63. Ces sous-unités sont essentielles à la reconnaissance des promoteurs de type 2 de la PolIII, en se liant aux boîtes A et B localisées en amont du site d'initiation de la transcription (Marzouki et al., 1986; Deprez et al., 1999a; Ducrot et al., 2006) et au recrutement consécutif de TFIIIB et de la PolIII (Mylona et al., 2006).

SIRT1, Ki67, et TFIIIC forment un réseau protéique

Nous avons voulu vérifier que SIRT1 soit associé de façon stable avec Ki67, et TFIIIC au sein d'un même complexe protéique. Nous avons donc fractionné le complexe nucléaire SIRT1 (SNC) provenant de cellules Mef exprimant le gène *sirt1* étiqueté en 5' avec les épitopes FLAG et HA sur un gradient de glycérol (15-35%). Les différentes fractions ont ensuite migré sur un gel gradient dénaturant 4-12% et les protéines ont été colorées à l'argent. L'analyse des fractions par Western Blot nous a permis de conclure que SIRT1, TFIIIC, et Ki67 forment un complexe macromoléculaire unique, suggérant une fonction commune pour ces trois partenaires.

Quels sont les domaines d'interaction liant les trois partenaires protéiques ?

L'identification non ambiguë de SIRT1, Ki67 et de TFIIIC dans les complexes SNC associés à SIRT1 et TFIIIC90 indique que ces trois protéines sont étroitement associées, mais ne permet pas de distinguer entre une liaison directe et indirecte. Pour répondre à cette question, il serait intéressant de construire des fusions GST-Ki67, FLAG-SIRT1, et His-TFIIIC90, puis de co-exprimer FLAG-SIRT1/GST-Ki67; FLAG-SIRT1/His-TFIIIC90 dans des cellules bactériennes. Ces constructions seront ensuite purifiées par une technique d'immunoprécipitation utilisée en routine au laboratoire (Shuaib et al., 2010). La migration

sur un gel SDS coloré au bleu de Coomassie, ainsi qu'une analyse par Western Blot avec les anticorps correspondants aux trois partenaires nous permettra de conclure sur le type de liaison les unissant. Si cette liaison s'avère être directe, il serait alors intéressant de mapper les domaines d'interaction de SIRT1 avec Ki67 et TFIIC90. Nous avons quelques informations concernant la structure de ces protéines, nous permettant de suggérer une stratégie d'analyse de ces interactions. Les analyses détaillées de la structure de Ki67 nous ont amené à la découverte de deux domaines principaux, un domaine FHA et un domaine composé de séquences répétées (Li et al., 2004). Nous ciblons le domaine FHA qui est impliqué dans la reconnaissance d'épitopes contenant des phosphoprotéines (pT) des procaryotes aux eucaryotes. On le retrouve dans plus de 200 protéines de fonctions variées comme la transduction du signal, la transcription lorsqu'il est associé à des facteurs de transcription ou le transport de protéines lorsqu'il est associé à la kinésine. Son rôle paraît multiple car il possède de multiples cibles, spécifiques à chaque protéine qui le contient. Trois facteurs majeurs contrôlent l'interaction de FHA avec ses protéines cibles: un résidu pT, les résidus +1 à +3, et une surface de liaison étendue. La variation de ces trois facteurs est probablement la cause de la grande diversité dans la fonction et la spécificité des domaines FHA (Li et al., 2004). La sous-unité TFIIC90, quant à elle, contient deux motifs en doigts de zinc, dans sa région C-terminale, pouvant être impliqués dans des interactions protéines-ADN et/ou dans des interactions protéines-protéines. De plus, TFIIC90 a une propriété particulière, puisqu'elle a une activité HAT intrinsèque pour l'histone H3 nucléosomale et acétyle préférentiellement la lysine 14 de l'histone H3 (Hsieh et al., 1999). En utilisant le même type de stratégie qu'auparavant, nous pourrions construire différentes fusions GST-Ki67 et His-TFIIC90 mutantes délétées de ces domaines potentielles d'interaction, les co-exprimer dans des cellules bactériennes et les immunoprécipiter afin de déterminer les acides aminés nécessaires à ces différentes interactions.

Un complexe répresseur de la machinerie de transcription de la PolIII

L'activité de l'HDAC SIRT1 est synonyme de répression transcriptionnelle (Forsberg and Bresnick, 2001; Wade, 2001). Comme les HAT, les HDAC opèrent rarement seules et sont souvent retrouvés au sein de complexes multiprotéiques répresseurs. D'une manière générale, le premier signal de répression est localisé sur l'ADN lui-même. Il s'agit de groupements méthyles sur des cytosines en 5' des guanosines (îlots CpG). Ces îlots CpG permettent le recrutement des HDACs par l'intermédiaire de protéines liant ces groupements

méthyls (Methy-CpG-binding-domain-containing-protein) ou d'enzymes de méthylation de l'ADN (ADN méthyltransférases). La formation de tels complexes constitue l'un des modes de régulation de l'activité HDAC, auquel il faut ajouter la localisation cellulaire de ces enzymes et les modifications post-traductionnelles dont elles font l'objet telles que la phosphorylation par exemple (Sengupta and Seto, 2004). L'activité enzymatique des HDACs, ainsi que leur participation à de nombreux complexes de répression en font des co-répresseurs transcriptionnels (de RUIJTER et al., 2003). A travers la diversité de ses substrats, SIRT1 est principalement associée à la machinerie de transcription PolIII. En effet, elle joue un rôle clé dans la répression des gènes transcrits par la PolIII, et ainsi, son mécanisme de déacétylation des résidus lysines permet de réguler un bon nombre de mécanismes fondamentaux (Houtkooper et al., 2012). Le fait que TFIIC soit dans le complexe SNC associé à SIRT1 suggère que SIRT1 puisse être impliqué de la même manière dans la répression de la machinerie de transcription de la PolIII.

TFIIC est un facteur de transcription essentiel dans l'activation des promoteurs de type 2 de l'ARN polymérase III (Paule and White, 2000; Schramm and Hernandez, 2002). La plupart des gènes de classe III, dans lesquels sont inclus les ARNt, les ARN VAs, Alu, EBER, 7SL, B1 et B2, ont des promoteurs de type 2 composé d'une boîte A et B intragéniques. Ces boîtes A et boîtes B sont reconnues directement par TFIIC (Lassar et al., 1983). Après la liaison de TFIIC, la voie de recrutement de la polymérase est similaire à celle des promoteurs de type 1, avec le recrutement consécutif de TFIIB et de l'ARN polymérase III. En considérant que SIRT1 et TFIIC se trouvent au sein d'un même complexe, nous avons émis l'hypothèse que SIRT1 influence le niveau d'expression de ces gènes précédemment cités.

Nous avons donc utilisé une approche génétique pour étudier les effets de la délétion de *sirt1* sur l'activité de la machinerie de transcription de la PolIII et plus spécifiquement, sur le niveau d'expression des transcrits PolIII issus des promoteurs intragéniques de type II, à la fois chez la souris, et dans un modèle cellulaire. La clinique de la souris de l'IGBMC nous a fourni une souris hétérozygote pour *sirt1* (*sirt1*^{+/-}) où l'un des allèles a été délété par recombinaison homologe. Il faut noter que les souris *sirt1*^{-/-} ne sont pas viables et meurent 2 à 3 semaines après la naissance (Dey et al., 2008). Nous avons alors croisés les souris *sirt1*^{+/-} entre elles pour générer des souris sauvage *sirt1*^{+/+} ou invalidée pour *sirt1*^{-/-}. Nous avons ensuite dérivé des lignées cellulaires à partir de fibroblastes embryonnaires (MEF) de ces souris. Nous avons ainsi obtenus des MEF homozygotes *sirt1*^{+/+} ou *sirt1*^{-/-} et développé quatre lignées différentes, l'une sauvage *sirt1*^{+/+}, l'une délétée pour *Sirt1*^{-/-}, l'une

rétablissant l'expression de Sirt1 dans la lignée *sirt1*^{-/-} avec un transgène rétrovirale *sirt1rescue*, et enfin l'une mutante non fonctionnelle pour la fonction déacétylase *sirt1H363Y*.

Nous avons fait une étude *in cellulo* et une étude *chez l'animal* à différents stades du développement embryonnaire de la souris. Ainsi, nous avons prélevé des embryons totaux à J13, et deux organes ayant de grandes fonctions métaboliques (Foie et Intestin Grêle) chez des souris à la naissance, à J7 et à J13. Nous avons extrait leurs ARN totaux et mesuré par RT-PCR quantitative l'expression d'un panel de gènes transcrits par la PolIII (SINE B1 ; SINE B2 ; LINE-L1 ; ARN 7SK ; ARN 7SL ; ARNr5S ; ARNt tyr ; Mariner ; Charlie). De manière tout à fait intéressante, les expériences de RT-qPCR *in vitro* sur des MEF et *ex vivo* sur des embryons totaux et des organes (Foie et Intestin Grêle) de Souris ont mis évidence qu'en l'absence de SIRT1 ou en présence du mutant non fonctionnel de SIRT1, SIRT1H363Y, le niveau d'expression des transcrits PolIII et plus particulièrement des SINE-B1, -B2 et des LINE-L1 est dérégulé de façon très importante. En effet, ces séquences sont anormalement activement transcrites lorsque SIRT1 ne peut jouer son rôle de régulateur négatif de la transcription PolIII. Ces résultats suggèrent également que SIRT1 joue un rôle spécifique sur la fixation de TFIIC au niveau des promoteurs de type 2 intragéniques, bien plus que sur les autres types de promoteurs reconnus par la PolIII.

SINEs, LINEs, déchets génomiques ?

Les SINEs et les LINEs sont respectivement des courts et des longs éléments rétrotransposables entrelacées, qui s'insèrent sur des nouveaux sites génomiques en utilisant des intermédiaires ARN (**Figure 19**). Les SINEs et les LINEs sont retrouvés chez presque tous les eucaryotes (à l'exception de *S. Cerevisiae*) et ensemble, comptent pour au moins 34% du génome humain. Les LINEs contiennent un promoteur interne, promoteur inhabituel reconnu par l'ARN Polymérase II, un ou deux ORFs, et un site de polyadénylation terminal 3'. ORF1 code pour une protéine essentiel sans fonction connue (Weiner, 2002), alors que ORF2 code pour un polypeptide bi-fonctionnel qui a à la fois une activité de transcriptase inverse et une activité d'endonucléase (Weiner, 2002). Le transcrit LINE polyadénylé est exporté dans le cytoplasme (Pasquinelli et al., 1997; Paca et al., 2000) et traduit. Cependant, la protéine naissante ayant une activité de transcriptase inverse se lie spécifiquement en cis à l'ARN LINE le codant (Kimberland et al., 1999; Esnault et al., 2000; Wei et al., 2001). Le complexe ribonucléoprotéique résultant d'un ARN LINE fonctionnel entre ensuite dans le noyau, où il initie un processus appelé "target-primed reverse transcription" (Transcription inverse ciblé)

(Figure 19). Il est intéressant de noter que notre étude, montre, par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la PolIII, que les LINE-L1 sont sous la dépendance de cette polymérase et non de la PolII comme il est couramment pensé. En 1995, l'étude *in vitro* de Kurose et al., avait déjà révélé que la transcription à partir du promoteur humain L1 est hautement sensible à la tagetitoxine, un inhibiteur sélectif de la PolIII, mais insensible à 1µg/ml d' α -amanitine, indiquant que le promoteur L1 humain est dépendant de la PolIII. La dépendance à la PolIII est confortée par leur observation que L1 et le promoteur du gène ARNt dépendant de la PolIII partagent un facteur nucléaire commun YY1. YY1 est aussi un facteur de transcription PolII (Kurose et al., 1995), mais YY1 est nécessaire également pour la transcription des ARNt. Des études ont révélées que les systèmes PolII et PolIII partagent également un facteur de transcription commun TBP, qui est une sous-unité de TFIIB dans la transcription des gènes issus des promoteurs de la PolIII (Huet and Sentenac, 1992; Taggart et al., 1992; White and Jackson, 1992; Kassavetis et al., 1992b; Lobo et al., 1992b). Usheva et Shenk ont montré que YY1 se lie à TBP (Usheva and Shenk, 1994). Dans l'assemblage du complexe de préinitiation pour la transcription de la PolIII, TFIIC se lie au promoteur et recrute TFIIB (Geiduschek, 1988; Gabrielsen and Sentenac, 1991). Il est tout à fait concevable que TFIIC et TFIIB peuvent s'associer à travers une interaction d'YY1 et TBP. Les SINEs sont similaires aux LINEs, mais plus courts, plus simples, et sont surtout dépendants des fonctions de transcription inverse et d'endonucléase des LINEs pour leur rétroposition. Les SINEs ont un promoteur interne pour la PolIII au lieu de la PolII, une séquence 3'-terminale riche en A au lieu du signal de polyadénylation, ne contient aucun ORFs significatifs, mais fonctionne comme les LINEs. Le transcrit ARN est ensuite transcrit de façon inverse et inséré dans un nouvel endroit du génome **(Figure 19)**. Depuis le moment de leurs découvertes, les SINEs et les LINEs ont été traités comme des parasites génomiques, une infection interne qui pourrait être tenu en échec mais rarement guéri. Cependant l'évolution, comme la science, est en proie à des revers de fortune. Les SINEs, d'abord considérés comme une source de stress génomique, pourrait en fait aider les cellules à faire face à des stress physiologiques qui induisent leur transcription comme le choc thermique ou l'inhibition traductionnelle (Liu et al., 1995; Chu et al., 1998; Li, 2001).

L'augmentation du niveau d'expression des SINEs et des LINEs entraîne une consommation anormale d'ATP

SIRT1 est connu pour réguler le métabolisme énergétique. En effet, son activité catalytique, de déacétylation des résidus lysines, est dépendante du NAD⁺, liant le métabolisme énergétique à l'expression génique. SIRT1 est connu pour activer des voies de signalisation permettant d'augmenter la production d'ATP mitochondriale afin de réguler les voies métaboliques des glucides et des lipides (Yu, 2009). De plus, il est intéressant de noter que les souris *Sirt1*^{-/-} sont hypermétaboliques mais léthargiques, avec une consommation d'ATP anormalement haute et une production d'ATP mitochondriale inefficace suggérant que le système de production d'énergie est défectueux (Boily et al., 2008). Par conséquent, nous avons donc émis l'hypothèse que la dérégulation de la machinerie de transcription de la PolIII peut affecter le métabolisme énergétique en ciblant le ratio ATP/ADP. Pour ce faire, nous avons effectué une étude *in vitro* en utilisant les lignées cellulaires développées au laboratoire. Nous avons évalué les conséquences de la surexpression des transcrits LINE-L1 et des SINEs-B1, -B2 sur la consommation d'ATP en mesurant le ratio ATP/ADP. De manière intéressante, nous avons observé que la délétion de *sirt1* ou la mutation non fonctionnelle de son activité déacétylase dérégule le ratio ATP/ADP de la même façon que le niveau de transcription des transcrits de la PolIII puisque ces deux conditions amènent à une consommation aberrante d'ATP alors que les cellules produisent moins d'ATP. La surexpression de ces séquences a donc une conséquence sur le métabolisme énergétique. Par cette étude, nous pouvons donc suggérer que la production inefficace et le phénotype hypermétabolique des souris *sirt1*^{-/-} est une conséquence de la transcription aberrante des LINEs et des SINEs.

L'absence de *sirt1* change la composition de la machinerie de transcription de la PolIII

Afin de mieux comprendre la relation entre SIRT1 et ses partenaires, et l'effet de l'histone déacétylase sur la composition de la machinerie de transcription PolIII, nous avons pensé qu'il était judicieux de comparer la composition des complexes SNC TFIIC90 dans des cellules Mef sauvages et Mef *sirt1*^{-/-}. Nous avons donc utilisé dans les deux cas la construction TFIIC90 développée au laboratoire, étiquetée en 5' avec les épitopes FLAG et

HA. En utilisant la même technique que celle employée pour SIRT1, nous avons purifié les deux complexes SNC TFIIC90. L'analyse par spectrométrie de masse et par Western Blot nous a permis d'étudier la composition des deux complexes TFIIC90.

En effet, l'absence de *sirt1* provoque tout d'abord la disparition de Ki67 suggérant une interaction directe entre l'histone déacétylase et le marqueur de prolifération cellulaire. Le fait que Ki67 suive le devenir de SIRT1 dans les cellules *Mef sirt1*^{-/-} suggère que Ki67 agit de manière coordonnée avec SIRT1 pour la répression de la machinerie de transcription PolIII. Bien que la fonction de Ki67 demeure très peu connue, des travaux récents ont émis l'hypothèse de l'implication de Ki67 dans l'inhibition de la synthèse par l'ARN polymérase I des ARN ribosomiaux *in vivo*, sans que ce mécanisme d'inhibition ne soit compris (Bullwinkel et al., 2006 ; Rahmanzadeh et al., 2007). En effet, les auteurs ont proposé que ce mécanisme de répression soit dû à une inactivation fonctionnelle directe de Ki67, ou à l'inhibition d'un membre de la machinerie de transcription PolII se trouvant à proximité. Quoi qu'il en soit, la disponibilité des molécules d'ARNs ribosomiques est une clé régulatrice pour la production des ribosomes, et par conséquent détermine le potentiel pour la croissance cellulaire et la prolifération. L'identification de cette fonction est la première preuve de la participation de Ki67 à un mécanisme répresseur de la transcription. Notre étude, cependant, ne nous a pas permis de conclure sur la nécessité de SIRT1 de déacétyler Ki67 pour le piéger. Pour cela, nous avons utilisé la lignée cellulaire *Mef sirt1H363Y* inactivant par ce biais la fonction déacétylase de Sirt1 pour purifier les complexes SNC (soluble) et CAC (chromatinien) SIRT1H363Y. De manière tout à fait intéressante, on remarque que la mutation est efficace pour augmenter le statut global d'acétylation du complexe mais pas pour recruter le facteur Ki67, suggérant que le recrutement dépendant de SIRT1 de Ki67 sur la chromatine n'est pas dépendant de l'activité enzymatique de SIRT1, donc on pourrait s'attendre à une interaction physique directe entre ces deux protéines afin d'exécuter conjointement leur activité répressive de la transcription PolIII.

De plus, nous avons pu observer le recrutement de nombreuses marques de chromatine transcriptionnellement active, à savoir la variante d'histone H3.3., la chaperonne déposant H3.3. sur la chromatine, DAXX (Drané et al., 2010), et l'histone Acétyl-transférase, PCAF dans le complexe TFIIC90 dans les *Mef sirt1*^{-/-}. Enfin, le statut d'acétylation du complexe TFIIC90 dans les cellules *Mef sirt1*^{-/-} augmente de manière drastique. Autant de preuves qui démontrent que SIRT1 a un effet répresseur sur la transcription de la PolIII, mais également sur la fonction de TFIIC90. TFIIC90 est doté d'une fonction HAT, avec comme substrat principal la lysine 14 de l'histone H3 (Hsieh et al., 1999). Cette modification épigénétique est

également la cible de nombreux autres co-activateurs transcriptionnels ayant une activité HAT tels que GCN5 chez la levure et l'Homme et TAFII230 chez la Drosophile (Mizzen et al., 1996; Lin et al., 1999). Cette étude nous permet de suggérer que SIRT1 inhibe la fonction HAT de TFIIC90 puisqu'en sa présence le complexe associé à TFIIC90 est incapable de recruter le co-activateur transcriptionnel PCAF et la chaperone Daxx à l'origine du remplacement de l'histone H3.1 par sa variante H3.3, marque d'une chromatine transcriptionnellement active. La délétion de *sirt1* peut entraîner un déséquilibre de la balance entre les activités HAT et HDAC nécessaire à la régulation de la transcription. Le déséquilibre entre les activités HAT et HDAC cellulaires en conditions pathologiques est d'ores et déjà connu, puisqu'un tel dérèglement a été rapporté dans différents cancers (Espino et al., 2005).

SIRT1 et Ki67 sont interdépendants au cours de la prolifération cellulaire

Pour déterminer l'importance de la relation entre Ki67, SIRT1 et la transcription PolIII des SINEs et des LINEs, nous avons mimé dans un premier temps les conditions de prolifération et de différenciation de cellules C2C12 puisqu'on sait que Ki67 ne s'exprime que dans des cellules en prolifération, puis mimé l'effet de cette différenciation en détruisant l'expression de Ki67 par shRNA. Et de manière tout à fait intéressante, on a observé qu'au cours de la différenciation des ces cellules C2C12 en myotubes l'expression de SIRT1 diminue au moment où Ki67 disparaît sous l'effet de la différenciation. Par ailleurs, les expériences de RT-qPCR montrent que l'absence de Ki67 entraîne une augmentation de la transcription des SINEs et des LINEs en accord avec nos premières conclusions. On peut donc conclure que Ki67 est un acteur majeur, au même titre que SIRT1, de la régulation de la machinerie de transcription PolIII.

L'effet de la transcription PolIII peut avoir une conséquence sur la prolifération cellulaire

En effectuant un test de prolifération cellulaire en présence ou en absence de SIRT1 (Figure supplémentaire), nous avons essayé de répondre de manière préliminaire à la question de l'effet de la dérégulation de la machinerie de transcription PolIII au niveau de la division cellulaire. Nous avons effectué un test de prolifération cellulaire sur 72 heures, où nous avons mesuré toutes les 12 heures le nombre de cellules présentes dans nos cultures. On se rend

compte que la prolifération des cellules Mef diminue lorsqu'on déplete Sirt1, au même titre que l'incorporation du mutant non fonctionnel de Sirt1, suggérant d'une interconnexion entre l'absence de SIRT1, la sous-expression de Ki67, l'augmentation de la transcription PolIII et la régulation normale de la prolifération cellulaire.

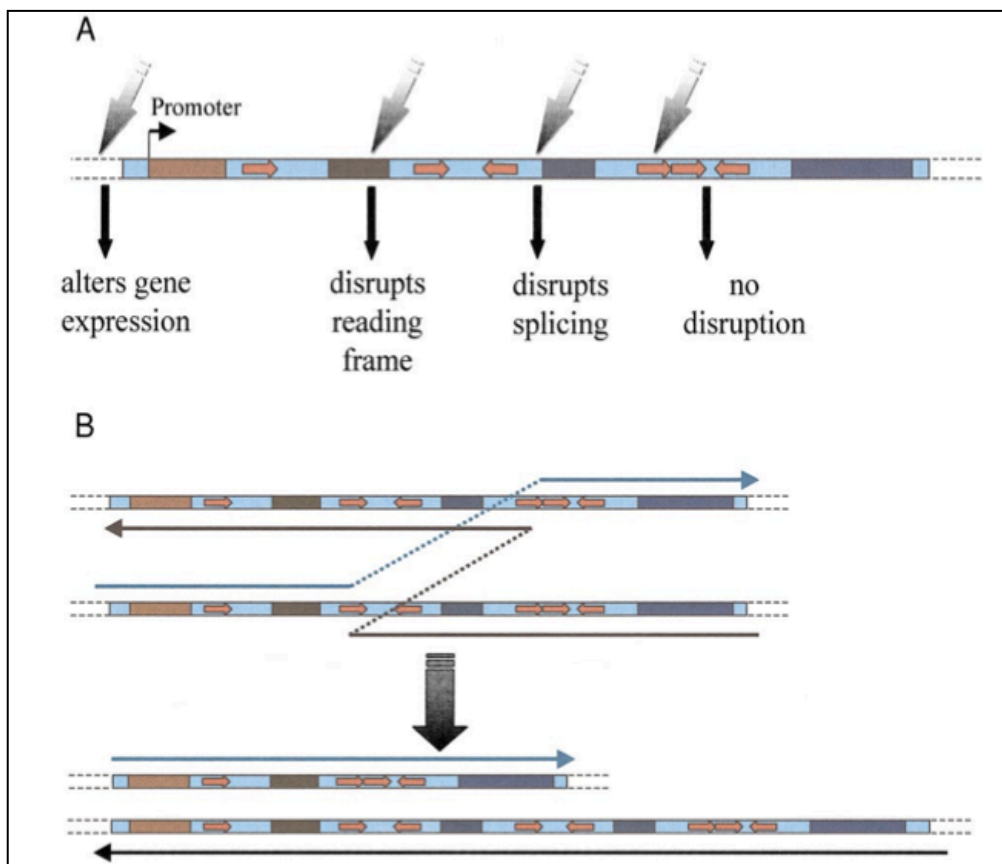


Figure 19. Représentation schématique des dommages induits par les rétrotransposons dans le génome humain. (A) Illustration des conséquences potentielles de l'insertion d'un nouvel élément à proximité d'un gène. Les boîtes colorées représentent différents exons d'un gène. Les flèches rouges montrent les éléments Alu existants orientés dans différentes directions dans les introns d'un gène. En fonction du site d'insertion, l'élément Alu a une probabilité d'impact différente sur le génome. (B) Représentation d'une recombinaison homologue inégale se déroulant entre deux éléments Alu dans différents introns d'un gène. Les flèches dotées de lignes en pointillé montre le chemin d'un événement de recombinaison. Les gènes ci-dessous montre qu'une copie peut obtenir une délétion alors que l'autre dupliquera sa séquence génique. Chacune des copies peut être nocive.

6. Conclusion

A travers tous ces résultats, on a pu mettre en évidence que SIRT1 et Ki67 ont un rôle de répression de la transcription de la PolIII. Ces deux protéines sont interdépendantes, et interagissent ensemble, seulement nous n'avons pas encore caractérisé le type de lien unissant ces deux protéines. Toutefois, même si nous savions déjà que SIRT1 est un répresseur de la transcription de la PolIII en inhibant un bon nombre de protéines impliqués dans le métabolisme cellulaire, et que Ki67 a un lien dans l'inhibition de la synthèse par l'ARN polymérase I des ARNr, ce travail montre pour la première fois une régulation de la transcription PolIII par SIRT1 et Ki67. Ces deux protéines sont interdépendantes et interagissent ensemble. Malheureusement, nous n'avons pas encore caractérisé le type de connexions entre ces deux protéines. Notre travail, établie la base d'un nouveau réseau protéique impliquant Ki67 et SIRT1 dans la répression de la transcription des séquences répétées dépendante de la PolIII. Les conséquences de la surexpression des séquences répétées SINEs et LINEs demeurent évasives puisqu'elles ont peu de fonctions connues, bien que, respectivement, elle représente 13% et 21% du génome humain.

Il est important de noter que, diverses études, réalisées chez l'Homme, ont permis d'associer ces séquences répétées à différentes pathologies. Les séquences Alu représentent environ 5% du génome humain. L'insertion de séquences Alu, assez loin en amont d'un gène, n'a pas d'influence sur son expression. Cependant, la présence d'éléments Alu à l'intérieur ou à proximité de régions promotrices d'un gène influence l'expression de gènes spécifiques, aussi bien que la possibilité d'ajouter des éléments de transcription dans une région génique en amont (Britten, 1996). Très peu d'éléments Alu se retrouvent dans les régions 5' non-codantes ou codantes des exons, sans doute parce que des insertions à ces endroits sont trop perturbantes pour la fonction des gènes cibles. Les éléments Alu se trouvent principalement dans les régions codantes pour des protéines au niveau des extrémités carboxy-terminales. Le fait que l'insertion des séquences Alu soit assez loin en aval de la région promotrice permet d'aboutir à une extrémité C-terminale nouvelle qui ne perturbe pas la structure générale de la protéine (Britten, 1996). On trouve également couramment des insertions Alu, en grande partie dans des régions introniques, ce qui ne modifie pas de façon significative la fonction des gènes. La grande majorité des éléments Alu, qui ont conduit à des maladies, se sont insérés dans des exons codants ou dans des introns relativement proches d'un exon altérant probablement le mécanisme d'épissage des introns. En plus de leur insertions, les éléments Alu peuvent subir des phénomènes de recombinaison non homologues amenant à un haut degré de mutation, et ainsi causer des mutations de délétion ou d'insertion. La recombinaison peut se passer entre éléments Alu sur différents chromosomes, résultant en des translocations

chromosomiques ou de façon plus complexe à des réarrangements chromosomaux. Il existe également des rapports concernant l'implication des rétrotransposons dans les maladies humaines en utilisant un bon nombre de mécanismes, incluant la recombinaison homologe inégale, l'insertion de L1 directement dans les gènes, et en fournissant la machinerie d'insertion dans des séquences codantes pour les autres rétrotransposons. Les éléments Alu, comme les LINE-L1, chez l'Homme, sont à l'origine de nombreuses maladies génétiques, maladies métaboliques, et de différents cancers (**Figure 20**). L'étude des mécanismes de régulation transcriptionnelle des SINEs et des LINEs est fondamentale à notre compréhension du contrôle de la fréquence d'insertions de ces rétrotransposons à travers le génome.

Transposable elements		Occurrences	Percent (%)
Family	Subfamily		
SINE	Alu	20	1.44
	AluJ	171	12.35
	AluS	244	17.62
	MIR	250	18.05
	FAM	2	0.14
	FRAM	18	1.30
	FLAM	37	2.67
LINE	HAL	13	0.94
	L1HS	1	0.07
	L1P	18	1.30
	L1M	153	11.05
	L2	151	10.90
	L3	25	1.81

Figure 20. Distribution dans les cancers des différents SINEs et LINEs

7. Références

Aasland, R., Stewart, A.F., and Gibson, T. (1996). The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 87–88.

Adkins, M.W., and Tyler, J.K. (2004). The histone chaperone Asf1p mediates global chromatin disassembly in vivo. *J. Biol. Chem.* *279*, 52069–52074.

Afshar, G., and Murnane, J.P. (1999). Characterization of a human gene with sequence homology to *Saccharomyces cerevisiae* SIR2. *Gene* *234*, 161–168.

Agalioti, T., Chen, G., and Thanos, D. (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* *111*, 381–392.

Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T., and Thanos, D. (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* *103*, 667–678.

Ahuja, N., Schwer, B., Carobbio, S., Waltregny, D., North, B.J., Castronovo, V., Maechler, P., and Verdin, E. (2007). Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* *282*, 33583–33592.

Allen, T.A., Kaenel, Von, S., Goodrich, J.A., and Kugel, J.F. (2004). The SINE-encoded mouse B2 RNA represses mRNA transcription in response to heat shock. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 816–821.

Almouzni, G., Khochbin, S., Dimitrov, S., and Wolffe, A.P. (1994). Histone acetylation influences both gene expression and development of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* *165*, 654–669.

Anantharaman, V., and Aravind, L. (2008). Analysis of DBC1 and its homologs suggests a potential mechanism for regulation of sirtuin domain deacetylases by NAD metabolites. *Cell Cycle* *7*, 1467–1472.

Andrau, J.C., and 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.

Andrau, J.C., Sentenac, A., and Werner, M. (1999). Mutagenesis of yeast TFIIB70 reveals C-terminal residues critical for interaction with TBP and C34. *Journal of Molecular Biology* *288*, 511–520.

Angelov, D., Verdel, A., An, W., Bondarenko, V., Hans, F., Doyen, C.-M., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Roeder, R.G., Bouvet, P., et al. (2004). SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *Embo J.* *23*, 3815–3824.

Annunziato, A.T. (2005). Split decision: what happens to nucleosomes during DNA replication? *J. Biol. Chem.* *280*, 12065–12068.

Annunziato, A.T., and Seale, R.L. (1983). Histone deacetylation is required for the maturation of newly replicated chromatin. *J. Biol. Chem.* *258*, 12675–12684.

- Araki, T., Sasaki, Y., and Milbrandt, J. (2004). Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 305, 1010–1013.
- Archambault, J., Lacroute, F., Ruet, A., and Friesen, J.D. (1992). Genetic interaction between transcription elongation factor TFIIS and RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4142–4152.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E., and Moudrianakis, E.N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10148–10152.
- Armache, K.-J., Mitterweger, S., Meinhart, A., and Cramer, P. (2005). Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J. Biol. Chem.* 280, 7131–7134.
- Arrebola, R., Manaud, N., Rozenfeld, S., Marsolier, M.C., Lefebvre, O., Carles, C., Thuriaux, P., Conesa, C., and Sentenac, A. (1998). Tau91, an essential subunit of yeast transcription factor IIIC, cooperates with tau138 in DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1–9.
- Athanikar, J.N., Badge, R.M., and Moran, J.V. (2004). A YY1-binding site is required for accurate human LINE-1 transcription initiation. *Nucleic Acids Res.* 32, 3846–3855.
- Avalos, J., and Boeke, J. (2004). Structural Basis for the Mechanism and Regulation of Sir2 Enzymes. *Molecular Cell*, Vol. 13, 639–648.
- Bannister, A., Miska, E., and Görlich, D. (2000). Acetylation of importin- α nuclear import factors by CBP/p300. *Current Biology* 2000, 10:467–470.
- Bannister, A.J., Schneider, R., and Kouzarides, T. (2002). Histone methylation: dynamic or static? *Cell* 109, 801–806.
- Bar-Nahum, G., Epshtein, V., and Ruckenstein, A. (2005). A Ratchet Mechanism of Transcription Elongation and Its Control. *Cell*, Vol. 120, 183–193.
- Bardeleben, C., Kassavetis, G.A., and Geiduschek, E.P. (1994). Encounters of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III with its transcription factors during RNA chain elongation. *Journal of Molecular Biology* 235, 1193–1205.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823–837.
- Bartholomew, B., Durkovich, D., Kassavetis, G.A., and Geiduschek, E.P. (1993). Orientation and topography of RNA polymerase III in transcription complexes *Mol. Cell. Biol.* 1993, 13(2):942..
- Bartholomew, B., Kassavetis, G.A., and 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, 5181–5189.
- Batzer, M.A., and Deininger, P.L. (2002). Alu repeats and human genomic diversity. *Nat. Rev. Genet.* 3, 370–379.

- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., et al. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* *444*, 337–342.
- Becker, P.B., and Hörz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 247–273.
- Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M., and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* *301*, 1090–1093.
- Bernstein, B. (2005). Genomic views of chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development* *15*, 476–481.
- Bernstein, E., Duncan, E.M., Masui, O., Gil, J., Heard, E., and Allis, C.D. (2006). Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2560–2569.
- Bhargava, P., and Kassavetis, G.A. (1999). Abortive initiation by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* *274*, 26550–26556.
- Birchler, J., and Bhadra, M.P. (2000). Making noise about silence: repression of repeated genes in animals. *Current Opinion in Genetics & Development* *10*, 211–216
- Bobkova, E.V., and Hall, B.D. (1997). Substrate specificity of the RNase activity of yeast RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* *272*, 22832–22839.
- Bochar, D.A., Wang, L., Beniya, H., Kinev, A., Xue, Y., Lane, W.S., Wang, W., Kashanchi, F., and Shiekhattar, R. (2000). BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* *102*, 257–265.
- Bogenhagen, D.F., Sakonju, S., and Brown, D.D. (1980). A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: II. The 3' border of the region. *Cell* *19*, 27–35.
- Boily, G., Seifert, E.L., Bevilacqua, L., He, X.H., Sabourin, G., Estey, C., Moffat, C., Crawford, S., Saliba, S., Jardine, K., et al. (2008). SirT1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice. *PLoS ONE* *3*, e1759.
- Bordone, L., Motta, M.C., Picard, F., Robinson, A., Jhala, U.S., Apfeld, J., McDonagh, T., Lemieux, M., McBurney, M., Szilvasi, A., et al. (2006). Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol.* *4*, e31.
- Borrow, J., Stanton, V.P., Andresen, J.M., Becher, R., Behm, F.G., Chaganti, R.S., Civin, C.I., Disteche, C., Dubé, I., Frischauf, A.M., et al. (1996). The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat. Genet.* *14*, 33–41.
- Boulard, M., Bouvet, P., Kundu, T.K., and Dimitrov, S. (2007). Histone variant nucleosomes: structure, function and implication in disease. *Subcell. Biochem.* *41*, 71–89.
- Boulikas, T. (1990). Poly(ADP-ribosylated) histones in chromatin replication. *J. Biol. Chem.*

265, 14638–14647.

Bovia, F., and Strub, K. (1996). The signal recognition particle and related small cytoplasmic ribonucleoprotein particles. *J. Cell. Sci.* *109* (Pt 11), 2601–2608.

Boyer, L.A., Latek, R.R., and Peterson, C.L. (2004). The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 158–163.

Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y., and Ogryzko, V. (1998). Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* *396*, 594–598.

Braglia, P., Percudani, R., and Dieci, G. (2005). Sequence context effects on oligo(dT) termination signal recognition by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* *280*, 19551–19562.

Britten, R.J. (1996). DNA sequence insertion and evolutionary variation in gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 9374–9377.

Brow, D.A., and Guthrie, C. (1990). Transcription of a yeast U6 snRNA gene requires a polymerase III promoter element in a novel position. *Genes & Development* *4*, 1345–1356.

Brown, D.C., and Gatter, K.C. (2002). Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* *40*, 2–11.

Brown, S.W., and Chandra, H.S. (1973). Inactivation system of the mammalian X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *70*, 195–199.

Brownell, J.E., and Allis, C.D. (1996). Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *6*, 176–184.

Brun, I., Sentenac, A., and Werner, M. (1997). Dual role of the C34 subunit of RNA polymerase III in transcription initiation. *Embo J.* *16*, 5730–5741.

Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., et al. (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* *303*, 2011–2015.

Buggy, J.J., Sideris, M.L., Mak, P., Lorimer, D.D., McIntosh, B., and Clark, J.M. (2000). Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem. J.* *350* Pt 1, 199–205.

Bullwinkel, J., Baron-Lühr, B., Lüdemann, A., Wohlenberg, C., Gerdes, J., and Scholzen, T. (2006). Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell. Physiol.* *206*, 624–635.

Burley, S.K., and Roeder, R.G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* *65*, 769–799.

Burlingame, R.W., Love, W.E., Wang, B.C., Hamlin, R., Nguyen, H.X., and Moudrianakis, E.N. (1985). Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 Å. *Science* *228*, 546–553.

- Cairns, B.R. (2004). Around the world of DNA damage INO80 days. *Cell* 119, 733–735.
- Cairns, C.A., and White, R.J. (1998). p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription. *Embo J.* 17, 3112–3123.
- Camier, S., Dechampsme, A.M., and Sentenac, A. (1995). The only essential function of TFIIA in yeast is the transcription of 5S rRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9338–9342.
- Campbell, F.E., and Setzer, D.R. (1992). Transcription termination by RNA polymerase III: uncoupling of polymerase release from termination signal recognition. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2260–2272.
- Candau, R., Moore, P.A., Wang, L., Barlev, N., Ying, C.Y., Rosen, C.A., and Berger, S.L. (1996). Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Mol. Cell. Biol.* 16, 593–602.
- Carey, M., Li, B., and Workman, J.L. (2006). RSC exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to RNA polymerase II elongation. *Mol. Cell* 24, 481–487.
- Carrozza, M.J., Utley, R.T., Workman, J.L., and Côté, J. (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* 19, 321–329.
- Carter, R., and 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, 1035–1043.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell Biol.* 5, 675–679.
- Chadwick, B.P., and Willard, H.F. (2001). Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1101–1113.
- Chamberlin, M. (1962). DEOXYRIBONUCLEIC ACID-DIRECTED SYNTHESIS OF RIBONUCLEIC ACID BY AN ENZYME FROM ESCHERICHIA COLI.
- Chantalat, S., Depaux, A., Héry, P., Barral, S., Thuret, J.-Y., Dimitrov, S., and Gérard, M. (2011). Histone H3 trimethylation at lysine 36 is associated with constitutive and facultative heterochromatin. *Genome Res.* 21, 1426–1437.
- Chaussivert, N., Conesa, C., Shaaban, S., and Sentenac, A. (1995). Complex interactions between yeast TFIIB and TFIIC. *J. Biol. Chem.* 270, 15353–15358.
- Chawla, S., Vanhoutte, P., and Arnold, F. (2003). Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5 *Journal of Neurochemistry*, 85, 151–159.
- Cheetham, G.M., and Steitz, T.A. (2000). Insights into transcription: structure and function of single-subunit DNA-dependent RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 117–123.

- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S., and Huang, S. (1999). Regulation of Transcription by a Protein Methyltransferase. *Science* 284, 2174
- Chen, D., Steele, A.D., Lindquist, S., and Guarente, L. (2005a). Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1. *Science* 310, 1641.
- Chen, H., Lin, R., Schiltz, R., Chakravarti, D., and Nash, A. (1997). ScienceDirect.com - Cell - Nuclear Receptor Coactivator ACTR Is a Novel Histone Acetyltransferase and Forms a Multimeric Activation Complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, Vol. 90, 569–580
- Chen, Z.Y., Wang, X., Zhou, Y., Offner, G., and Tseng, C.-C. (2005b). Destabilization of Krüppel-like factor 4 protein in response to serum stimulation involves the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 65, 10394–10400.
- Cheng, H.-L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J.P., Gu, Y., Patel, P., Bronson, R., Appella, E., Alt, F.W., and Chua, K.F. (2003). Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10794–10799.
- Cheung, P., Tanner, K.G., Cheung, W.L., Sassone-Corsi, P., Denu, J.M., and Allis, C.D. (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol. Cell* 5, 905–915.
- Chédin, S., Riva, M., Schultz, P., Sentenac, A., and Carles, C. (1998). The RNA cleavage activity of RNA polymerase III is mediated by an essential TFIIS-like subunit and is important for transcription termination. *Genes & Development* 12, 3857–3871.
- Cho, K., and Elizondo, L. (2004). Advances in chromatin remodeling and human disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14:308–315
- Chow, C.-M., Georgiou, A., Szutorisz, H., Maia e Silva, A., Pombo, A., Barahona, I., Dargelos, E., Canzonetta, C., and Dillon, N. (2005). Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep.* 6, 354–360.
- Churikov, D., Siino, J., Svetlova, M., Zhang, K., Gineitis, A., Morton Bradbury, E., and Zalensky, A. (2004). Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics* 84, 745–756.
- Civitaresse, A.E., Carling, S., Heilbronn, L.K., Hulver, M.H., Ukropcova, B., Deutsch, W.A., Smith, S.R., Ravussin, E., CALERIE Pennington Team (2007). Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med.* 4, e76.
- CLARK, M., HAMMERLE, T., WIMMER, E., and DASGUPTA, A. (1991). Poliovirus Proteinase-3c Converts an Active Form of Transcription Factor-Iiic to an Inactive Form - a Mechanism for Inhibition of Host-Cell Polymerase-Iii Transcription by Poliovirus. *Embo J.* 10, 2941–2947.
- Cleveland, D., Mao, Y., and Sullivan, K. (2003). Centromeres and kinetochores: From epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112, 407–421.
- Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E., Boeke, J., and Stoye, J. (1997). Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements (Cold Spring Harbor (NY):

Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Cohen, H.Y., Lavu, S., Bitterman, K.J., Hekking, B., Imahiyerobo, T.A., Miller, C., Frye, R., Ploegh, H., Kessler, B.M., and Sinclair, D.A. (2004a). Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol. Cell* 13, 627–638.

Cohen, H.Y., Miller, C., Bitterman, K.J., Wall, N.R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K.T., Gorospe, M., de Cabo, R., and Sinclair, D.A. (2004b). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305, 390–392.

Costanzi, C., and Pehrson, J.R. (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* 393, 599–601.

Cozzarelli, N.R., Gerrard, S.P., Schlissel, M., Brown, D.D., and Bogenhagen, D.F. (1983). Purified RNA polymerase III accurately and efficiently terminates transcription of 5S RNA genes. *Cell* 34, 829–835.

Cramer, P. (2006). Recent structural studies of RNA polymerases II and III. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1058–1061.

Cramer, P., and Bushnell, D. (2001). Structural Basis of Transcription: RNA Polymerase II at 2.8 Ångstrom Resolution. *Science* 292, 1863.

Crichton, D., Woiwode, A., Zhang, C., Mandavia, N., Morton, J.P., Warnock, L.J., Milner, J., White, R.J., and Johnson, D.L. (2003). p53 represses RNA polymerase III transcription by targeting TBP and inhibiting promoter occupancy by TFIIB. *Embo J.* 22, 2810–2820.

Dali-Youcef, N., Lagouge, M., Froelich, S., Koehl, C., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2007). Sirtuins: the “magnificent seven,” function, metabolism and longevity. *Ann. Med.* 39, 335–345.

DAS, G., HENNING, D., WRIGHT, D., and REDDY, R. (1988). Upstream Regulatory Elements Are Necessary and Sufficient for Transcription of a U6-Rna Gene by Rna Polymerase-Iii. *Embo J.* 7, 503–512.

de RUIJTER, A.J.M., van GENNIP, A.H., CARON, H.N., KEMP, S., and van KUILENBURG, A.B.P. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370, 737.

Deininger, P.L., and Batzer, M.A. (1999). Alu repeats and human disease. *Mol. Genet. Metab.* 67, 183–193.

Deininger, P.L., and Batzer, M.A. (2002). Mammalian retroelements. *Genome Res.* 12, 1455–1465.

Denu, J. (2003). Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD⁺-dependent deacetylases. *TRENDS in Biochemical Sciences* 28, 1.

Denu, J.M. (2005). The Sir 2 family of protein deacetylases. *Curr Opin Chem Biol* 9, 431–440.

Deprez, E., Arrebola, R., Conesa, W., and Sentenac, A. (1999a). A subunit of yeast TFIIC

participates in the recruitment of TATA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 8042–8051.

Deprez, M., D'Hooge, M., and Misson, J. (1999b). Infantile and juvenile presentations of Alexander's disease: a report of two cases. *Acta Neurologica Scandinavica* *99*: 158-165.

Dernburg, A.F., McDonald, K., Moulder, G., Barstead, R., Dresser, M., and Villeneuve, A.M. (1998). Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* *94*, 387–398.

Desai, N., Lee, J., Upadhyaya, R., Chu, Y., Moir, R.D., and Willis, I.M. (2005). Two steps in Maf1-dependent repression of transcription by RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* *280*, 6455–6462.

Dey, S., Bakthavatchalu, V., Tseng, M.T., Wu, P., Florence, R.L., Grulke, E.A., Yokel, R.A., Dhar, S.K., Yang, H.-S., Chen, Y., et al. (2008). Interactions between SIRT1 and AP-1 reveal a mechanistic insight into the growth promoting properties of alumina (Al₂O₃) nanoparticles in mouse skin epithelial cells. *Carcinogenesis* *29*, 1920–1929.

DEZELEE, S., WYERS, F., Sentenac, A., and FROMAGEOT, P. (1976). Two Forms of RNA Polymerase B in Yeast. Proteolytic Conversion in vitro of Enzyme BI into BII. *Eur J Biochem* *65*, 543–552.

Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* *399*, 491–496.

Dieci, G., and Sentenac, A. (1996). Facilitated recycling pathway for RNA polymerase III. *Cell* *84*, 245–252.

Dieci, G., and Sentenac, A. (2003). Detours and shortcuts to transcription reinitiation. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 202–209.

Dieci, G., Fiorino, G., Castelnuovo, M., and Teichmann, M. (2007). ScienceDirect.com - Trends in Genetics - The expanding RNA polymerase III transcriptome. *TRENDS in Genetics* Vol.23 No.12

Dieci, G., Percudani, R., Giuliodori, S., Bottarelli, L., and Ottonello, S. (2000). TFIIC-independent in vitro transcription of yeast tRNA genes. *Journal of Molecular Biology* *299*, 601–613.

Dover, G. (1980). Ignorant DNA? *Nature* *285*, 618–620.

Drané, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., and Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes & Development* *24*, 1253–1265.

Ducrot, C., Lefebvre, O., Landrieux, E., Guirouilh-Barbat, J., Sentenac, A., and Acker, J. (2006). Reconstitution of the yeast RNA polymerase III transcription system with all recombinant factors. *J. Biol. Chem.* *281*, 11685–11692.

Dumay, H., Rubbi, L., Sentenac, A., and Marck, C. (1999). Interaction between yeast RNA polymerase III and transcription factor TFIIC via ABC10alpha and tau131 subunits. *J. Biol. Chem.* *274*, 33462–33468.

- Dumay-Odelot, H., Acker, J., Arrebola, R., Sentenac, A., and Marck, C. (2002). Multiple Roles of the τ 131 Subunit of Yeast Transcription Factor IIIC (TFIIIC) in TFIIIB Assembly *Mol. Cell. Biol.* 22(1):298.
- Edmondson, D.G., Smith, M.M., and Roth, S.Y. (1996). Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4 *Genes Dev.* 10: 1247-1259.
- Eickbush, T.H., and Moudrianakis, E.N. (1978). The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry* 17, 4955–4964.
- Eissenberg, J.C. (2001). Molecular biology of the chromo domain: an ancient chromatin module comes of age. *Gene* 275, 19–29.
- Engelke, D.R., Ng, S.Y., Shastry, B.S., and Roeder, R.G. (1980). Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell* 19, 717–728.
- ESCHENLAUER, J., KAISER, M., GERLACH, V., and BROW, D. (1993). Architecture of a Yeast U6 Rna Gene Promoter. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3015–3026.
- Esnault, C., Maestre, J., and Heidmann, T. (2000). Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes nature genetics volume 24 .
- Espino, P., Drobic, B., and Dunn, K. (2005). Histone modifications as a platform for cancer therapy *Journal of Cellular Biochemistry* 94:1088–1102.
- Feige, J.N., Lagouge, M., Canto, C., Strehle, A., Houten, S.M., Milne, J.C., Lambert, P.D., Matak, C., Elliott, P.J., and Auwerx, J. (2008). Specific SIRT1 Activation Mimics Low Energy Levels and Protects against Diet-Induced Metabolic Disorders by Enhancing Fat Oxidation. *Cell Metabolism* 8, 347–358.
- Felton-Edkins, Z.A., Fairley, J.A., Graham, E.L., Johnston, I.M., White, R.J., and Scott, P.H. (2003). The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIIB. *Embo J.* 22, 2422–2432.
- Fernández-Tornero, C., Böttcher, B., Riva, M., Carles, C., Steuerwald, U., Ruigrok, R.W.H., Sentenac, A., Müller, C.W., and Schoehn, G. (2007). Insights into transcription initiation and termination from the electron microscopy structure of yeast RNA polymerase III. *Mol. Cell* 25, 813–823.
- Ferrari, R., and Dieci, G. (2008). The transcription reinitiation properties of RNA polymerase III in the absence of transcription factors. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 13, 112–118.
- Ferrari, R., Rivetti, C., Acker, J., and Dieci, G. (2004). Distinct roles of transcription factors TFIIIB and TFIIIC in RNA polymerase III transcription reinitiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 13442–13447.
- Ferri, M.L., Peyroche, G., Siaut, M., Lefebvre, O., Carles, C., Conesa, C., and Sentenac, A. (2000). A novel subunit of yeast RNA polymerase III interacts with the TFIIIB-related domain of TFIIIB70. *Mol. Cell. Biol.* 20, 488–495.
- Filetici, P., P, O., and Ballario, P. (2001). The bromodomain: a chromatin browser? *Front.*

Biosci. 6, D866–D876.

Finlan, L.E., Sproul, D., Thomson, I., Boyle, S., Kerr, E., Perry, P., Ylstra, B., Chubb, J.R., and Bickmore, W.A. (2008). Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet* 4, e1000039.

Finn, R.M., Browne, K., Hodgson, K.C., and Ausió, J. (2008). sNASP, a histone H1-specific eukaryotic chaperone dimer that facilitates chromatin assembly. *Biophys. J.* 95, 1314–1325.

Firestein, R., Blander, G., Michan, S., Oberdoerffer, P., Ogino, S., Campbell, J., Bhimavarapu, A., Luikenhuis, S., de Cabo, R., Fuchs, C., et al. (2008). The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS ONE* 3, e2020.

Fischer, D.D., Cai, R., Bhatia, U., Asselbergs, F.A.M., Song, C., Terry, R., Trogani, N., Widmer, R., Atadja, P., and Cohen, D. (2002). Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J. Biol. Chem.* 277, 6656–6666.

Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M.J., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Voelter, W., and Verdin, E. (2002). Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol. Cell* 9, 45–57.

Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., and Allis, C.D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438, 1116–1122.

Flores, A., Briand, J.F., Gadai, O., Andrau, J.C., Rubbi, L., Van Mullem, V., Boschiero, C., Goussot, M., Marck, C., Carles, C., et al. (1999). A protein-protein interaction map of yeast RNA polymerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7815–7820.

Ford, E., Strubin, M., and Hernandez, N. (1998). The Oct-1 POU domain activates snRNA gene transcription by contacting a region in the SNAPc largest subunit that bears sequence similarities to the Oct-1 coactivator OBF-1. *Genes & Development* 12, 3528–3540.

Ford, E., Voit, R., Liszt, G., Magin, C., Grummt, I., and Guarente, L. (2006). Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes & Development* 20, 1075–1080.

Forsberg, E.C., and Bresnick, E.H. (2001). Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world. *Bioessays* 23, 820–830.

Frye, R.A. (1999). Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 273–279.

Frye, R.A. (2000). Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 793–798.

Fulco, M., Schiltz, R., Iezzi, S., King, M., and Zhao, P. (2003). ScienceDirect.com - Molecular Cell - Sir2 Regulates Skeletal Muscle Differentiation as a Potential Sensor of the Redox State. *Mol. Cell*.

- Funabiki, H., Hagan, I., Uzawa, S., and Yanagida, M. (1993). Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J. Cell Biol.* *121*, 961–976.
- Gabrielsen, O.S., and Sentenac, A. (1991). RNA polymerase III (C) and its transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* *16*, 412–416.
- Galasinski, S.C., Resing, K.A., Goodrich, J.A., and Ahn, N.G. (2002). Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. *J. Biol. Chem.* *277*, 19618–19626.
- Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F., and Atadja, P. (2002). Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.* *277*, 25748–25755.
- Geiduschek, E. (1988). Transcription by RNA polymerase III. *Ann. Rev. Biochem.* *57*:873-914
- Geiduschek, E.P., and Kassavetis, G.A. (2001). The RNA polymerase III transcription apparatus. *Journal of Molecular Biology* *310*, 1–26.
- Geiduschek, E.P., and Kassavetis, G.A. (2006). Transcription: adjusting to adversity by regulating RNA polymerase. *Curr. Biol.* *16*, R849–R851.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., and Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* *133*, 1710–1715.
- Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J.T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S.-H., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., Wu, Z., and Puigserver, P. (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *Embo J.* *26*, 1913–1923.
- Giordano, A., and Avantaggiati, M.L. (1999). p300 and CBP: partners for life and death. *J. Cell. Physiol.* *181*, 218–230.
- Giuliodori, S., Percudani, R., Braglia, P., Ferrari, R., Guffanti, E., Ottonello, S., and Dieci, G. (2003). A composite upstream sequence motif potentiates tRNA gene transcription in yeast. *Journal of Molecular Biology* *333*, 1–20.
- Goll, M.G., and Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 481–514.
- Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N., and White, R.J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* *421*, 290–294.
- Goodman, R.H., and Smolik, S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes & Development* *14*, 1553–1577.
- Gorman, R., Johnson, R., and Spilman, C. (1983). Inhibition of platelet thromboxane A₂ synthase activity by sodium 5-(3'-pyridinylmethyl)benzofuran-2-carboxylate Volume 26, Issue 2, Pages 325–342.

- Gotta, M., Laroche, T., Formenton, A., Maillet, L., Scherthan, H., and Gasser, S.M. (1996). The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *134*, 1349–1363.
- Gottesfeld, J.M., Wolf, V.J., Dang, T., Forbes, D.J., and Hartl, P. (1994). Mitotic repression of RNA polymerase III transcription in vitro mediated by phosphorylation of a TFIIB component. *Science* *263*, 81–84.
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thévenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S., et al. (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J. Cell Biol.* *176*, 283–294.
- Gregory, P., and Wagner, K. (2001). Histone Acetylation and Chromatin Remodeling. *Experimental Cell Research* *265*, 195–202.
- Gridasova, A.A., and Henry, R.W. (2005). The p53 tumor suppressor protein represses human snRNA gene transcription by RNA polymerases II and III independently of sequence-specific DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 3247–3260.
- Guerardel, C., Deltour, S., Pinte, S., Monte, D., Begue, A., Godwin, A.K., and Leprince, D. (2001). Identification in the human candidate tumor suppressor gene HIC-1 of a new major alternative TATA-less promoter positively regulated by p53. *J. Biol. Chem.* *276*, 3078–3089.
- Guillemette, B., Bataille, A.R., Gévry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., and Gaudreau, L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol.* *3*, e384.
- Gusarov, I., and Nudler, E. (1999). The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol. Cell* *3*, 495–504.
- Haigis, M.C., and Guarente, L.P. (2006). Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.* *20*: 2913-2921.
- Haigis, M.C., Mostoslavsky, R., Haigis, K.M., Fahie, K., Christodoulou, D.C., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Karow, M., Blander, G., et al. (2006). SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* *126*, 941–954.
- Hallows, W.C., Lee, S., and Denu, J.M. (2006). Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 10230–10235.
- Hanas, J.S., Bogenhagen, D.F., and Wu, C.W. (1984). Binding of *Xenopus* transcription factor A to 5S RNA and to single stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* *12*, 2745–2758.
- Haurie, V., Durrieu-Gaillard, S., Dumay-Odelot, H., Da Silva, D., Rey, C., Prochazkova, M., Roeder, R.G., Besser, D., and Teichmann, M. (2010). Two isoforms of human RNA polymerase III with specific functions in cell growth and transformation. *PNAS*. vol. 107 no. 9 4176-4181.
- Haushalter, K.A., and Kadonaga, J.T. (2003). Chromatin assembly by DNA-translocating motors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 613–620.

- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S.M., and Grunstein, M. (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 80, 583–592.
- Heilbronn, L.K., and Ravussin, E. (2003). Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 361–369.
- Henikoff, S. (1994). A reconsideration of the mechanism of position effect. *Genetics* 138, 1–5.
- Herr, W., and Cleary, M.A. (1995). The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes & Development* 9, 1679–1693.
- HERSHEY, A.D., and CHASE, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36, 39–56.
- Hilt, W., and Wolf, D.H. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* 21, 96–102.
- Hirsch, H.A., Gu, L., and Henry, R.W. (2000). The retinoblastoma tumor suppressor protein targets distinct general transcription factors to regulate RNA polymerase III gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 20, 9182–9191.
- Hirsch, H.A., Jawdekar, G.W., Lee, K.-A., Gu, L., and Henry, R.W. (2004). Distinct mechanisms for repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5989–5999.
- Houtkooper, R.H., Pirinen, E., and Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 225–238.
- Howe, J.G., and Shu, M.D. (1989). Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements. *Cell* 57, 825–834.
- Hsieh, Y.J., Kundu, T.K., Wang, Z., Kovelman, R., and Roeder, R.G. (1999). The TFIIC90 subunit of TFIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7697–7704.
- Hu, P., Samudre, K., Wu, S., Sun, Y., and Hernandez, N. (2004). CK2 phosphorylation of Bdp1 executes cell cycle-specific RNA polymerase III transcription repression. *Mol. Cell* 16, 81–92.
- Hu, P., Wu, S., and Hernandez, N. (2003). A minimal RNA polymerase III transcription system from human cells reveals positive and negative regulatory roles for CK2. *Mol. Cell* 12, 699–709.
- Huang, Y., and Maraia, R.J. (2001). Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human. *Nucleic Acids Res.* 29, 2675–2690.
- Huang, Y., Hamada, M., and Maraia, R.J. (2000). Isolation and cloning of four subunits of a fission yeast TFIIC complex that includes an ortholog of the human regulatory protein

- TFIIICbeta. *J. Biol. Chem.* 275, 31480–31487.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F., and Yao, T.-P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455–458.
- Huet, J., and Sentenac, A. (1992). The TATA-binding protein participates in TFIIB assembly on tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 20, 6451–6454.
- Huet, J., Conesa, C., Manaud, N., Chaussivert, N., and Sentenac, A. (1994). Interactions between yeast TFIIB components. *Nucleic Acids Res.* 22, 3433–3439.
- Huhtiniemi, T., Wittekindt, C., Laitinen, T., Leppänen, J., Salminen, A., Poso, A., and Lahtela-Kakkonen, M. (2006). Comparative and pharmacophore model for deacetylase SIRT1. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 20, 589–599.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaerberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795–800.
- Imbalzano, A.N., Kwon, H., Green, M.R., and Kingston, R.E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* 370, 481–485.
- Ishiguro, A., Kassavetis, G., and Geiduschek, E. (2002). Essential roles of Bdp1, a subunit of RNA polymerase III initiation factor TFIIB, in transcription and tRNA processing. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3264–3275.
- Ito, T., Bulger, M., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (1996). Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3112–3124.
- Jackson, V., Granner, D., and Chalkley, R. (1976). Deposition of histone onto the replicating chromosome: newly synthesized histone is not found near the replication fork. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2266–2269.
- Janknecht, R., and Hunter, T. (1996). Transcription. A growing coactivator network. *Nature* 383, 22–23.
- Jasencakova, Z., Scharf, A.N.D., Ask, K., Corpet, A., Imhof, A., Almouzni, G., and Groth, A. (2010). Replication stress interferes with histone recycling and predeposition marking of new histones. *Mol. Cell* 37, 736–743.
- Jasiak, A.J., Armache, K.-J., Martens, B., Jansen, R.-P., and Cramer, P. (2006). Structural biology of RNA polymerase III: subcomplex C17/25 X-ray structure and 11 subunit enzyme model. *Mol. Cell* 23, 71–81.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Jin, Y.-H., Kim, Y.-J., Kim, D.-W., Baek, K.-H., Kang, B.Y., Yeo, C.-Y., and Lee, K.-Y. (2008). Sirt2 interacts with 14-3-3 beta/gamma and down-regulates the activity of p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368, 690–695.
- Jing, E., Gesta, S., and Kahn, C.R. (2007). SIRT2 regulates adipocyte differentiation through

- FoxO1 acetylation/deacetylation. *Cell Metabolism* 6, 105–114.
- Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & Development* 13, 2570–2580.
- Kalkhoven, E. (2004). CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochemical Pharmacology* 68, 1145–1155.
- Kamine, J., Elangovan, B., Subramanian, T., Coleman, D., and Chinnadurai, G. (1996). Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology* 216, 357–366.
- Kantor, B., Makedonski, K., Shemer, R., and Razin, A. (2003). Expression and localization of components of the histone deacetylases multiprotein repressory complexes in the mouse preimplantation embryo. *Gene Expr. Patterns* 3, 697–702.
- Kassavetis, G., Han, S., Naji, S., and Geiduschek, E. (2003). The role of transcription initiation factor IIIB subunits in promoter opening probed by photochemical cross-linking. *J. Biol. Chem.* 278, 17912–17917.
- Kassavetis, G.A., and 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, 7445–7451.
- Kassavetis, G.A., Bartholomew, B., Blanco, J.A., Johnson, T.E., and Geiduschek, E.P. (1991). Two essential components of the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor TFIIB: transcription and DNA-binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7308–7312.
- Kassavetis, G.A., Blanco, J.A., Johnson, T.E., and Geiduschek, E.P. (1992a). Formation of open and elongating transcription complexes by RNA polymerase III. *Journal of Molecular Biology* 226, 47–58.
- Kassavetis, G.A., Braun, B.R., Nguyen, L.H., and Geiduschek, E.P. (1990). *S. cerevisiae* TFIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIA and TFIIC are assembly factors. *Cell* 60, 235–245.
- Kassavetis, G.A., Driscoll, R., and Geiduschek, E.P. (2006). Mapping the principal interaction site of the Brl1 and Bdp1 subunits of *Saccharomyces cerevisiae* TFIIB. *J. Biol. Chem.* 281, 14321–14329.
- Kassavetis, G.A., Joazeiro, C.A., Pisano, M., Geiduschek, E.P., Colbert, T., Hahn, S., and Blanco, J.A. (1992b). 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.
- Kassavetis, G.A., Prakash, P., and 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, 2695–2706.
- Kasten, M., Szerlong, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Werner, M., and Cairns, B.R. (2004). Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *Embo J.* 23, 1348–1359.

- Kausch, I., Jiang, H., Brocks, C., and Bruderek, K. (2004). Ki-67-Directed Antisense Therapy in an Orthotopic Renal Cell Carcinoma Model. *European Urology* *46*, 118–125.
- Kausch, I., Lingnau, A., Endl, E., Sellmann, K., Deinert, I., Ratliff, T.L., Jocham, D., Sczakiel, G., Gerdes, J., and B hle, A. (2003). Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* *105*, 710–716.
- Kazazian, H.H. (1999). An estimated frequency of endogenous insertional mutations in humans. *Nat. Genet.* *22*, 130.
- Kedinger, C., Gniazdowski, M., Mandel, J.L., Gissinger, F., and Chambon, P. (1970). Alpha-amanitin: a specific inhibitor of one of two DNA-dependent RNA polymerase activities from calf thymus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *38*, 165–171.
- Keller, H.J., Romaniuk, P.J., and Gottesfeld, J.M. (1992). Interaction of Xenopus TFIIC with the TFIIA.5 S RNA gene complex. *J. Biol. Chem.* *267*, 18190–18198.
- Khoo, B., Brophy, B., and Jackson, S.P. (1994). Conserved functional domains of the RNA polymerase III general transcription factor BRF. *Genes & Development* *8*, 2879–2890.
- Kidwell, W.R., and Mage, M.G. (1976). Changes in poly(adenosine diphosphate-ribose) and poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase in synchronous HeLa cells. *Biochemistry* *15*, 1213–1217.
- Kim, E.-J., and Um, S.-J. (2008). SIRT1: roles in aging and cancer. *BMB Rep* *41*, 751–756.
- Kim, E.-J., Kho, J.-H., Kang, M.-R., and Um, S.-J. (2007). Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity. *Mol. Cell* *28*, 277–290.
- Kimberland, M.L., Divoky, V., Prchal, J., Schwahn, U., Berger, W., and Kazazian, H.H. (1999). Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 1557–1560.
- Klekamp, M.S., and Weil, P.A. (1982). Specific transcription of homologous class III genes in yeast-soluble cell-free extracts. *J. Biol. Chem.* *257*, 8432–8441.
- Kolthur-Seetharam, U., Dantzer, F., McBurney, M.W., de Murcia, G., and Sassone-Corsi, P. (2006). Control of AIF-mediated cell death by the functional interplay of SIRT1 and PARP-1 in response to DNA damage. *Cell Cycle* *5*, 873–877.
- Korber, P., and Hörz, W. (2004). In vitro assembly of the characteristic chromatin organization at the yeast PHO5 promoter by a replication-independent extract system. *J. Biol. Chem.* *279*, 35113–35120.
- Kornberg, R., and Thomas, J. (1974). Chromatin Structure: Oligomers of the Histones. *Science*. *184*, 865-868.
- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D.W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* *279*, 703–707.
- Krajewski, V.A., Lagarkova, M.A., Sharova, N.P., Stoliarov, S.D., and Ausio, J. (2001).

Doklady Biochemistry and Biophysics, Volume 377, Numbers 1-6 - SpringerLink. Doklady Biochemistry and Biophysics 377, 132–134.

Kraus, W.L., and Lis, J.T. (2003). PARP goes transcription. *Cell* 113, 677–683.

Kume, S., Uzu, T., Horiike, K., Chin-Kanasaki, M., Isshiki, K., Araki, S.-I., Sugimoto, T., Haneda, M., Kashiwagi, A., and Koya, D. (2010). Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *J. Clin. Invest.* 120, 1043–1055.

Kundu, T., Wang, Z., and Roeder, R. (1999). Human TFIIC relieves chromatin-mediated repression of RNA polymerase III transcription and contains an intrinsic histone acetyltransferase activity. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1605–1615.

KUNKEL, G., and PEDERSON, T. (1988). Upstream Elements Required for Efficient Transcription of a Human U6 Rna Gene Resemble Those of U1 and U2 Genes Even Though a Different Polymerase Is Used. *Genes & Development* 2, 196–204.

Kurose, K., Hata, K., Hattori, M., and Sakaki, Y. (1995). RNA polymerase III dependence of the human L1 promoter and possible participation of the RNA polymerase II factor YY1 in the RNA polymerase III transcription system. *Nucleic Acids Res.* 23, 3704–3709.

Kuzmichev, A., Margueron, R., Vaquero, A., Preissner, T.S., Scher, M., Kirmizis, A., Ouyang, X., Brockdorff, N., Abate-Shen, C., Farnham, P., et al. (2005). Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 102, 1859–1864.

Kwon, H. (2008). The ups and downs of SIRT1. *Trends in Biochemical Sciences* Vol.33 No.11.

Kwon, H., Brent, M., Getachew, R., and Jayakumar, P. (2008). ScienceDirect.com - Cell Host & Microbe - Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Protein Inhibits the SIRT1 Deacetylase and Induces T Cell Hyperactivation. *Cell Host & Microbe* 3, 158–167.

Lagouge, M., Argmann, C., and Gerhart-Hines, Z. (2006). ScienceDirect.com - Cell - Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127, 1109–1122.

Landrieux, E., Alic, N., Ducrot, C., Acker, J., Riva, M., and Carles, C. (2006). A subcomplex of RNA polymerase III subunits involved in transcription termination and reinitiation. *Embo J.* 25, 118–128.

Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S.T., Heller, R.C., Stebbins, J., Pillus, L., and Sternglanz, R. (2000). The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 97, 5807–5811.

Lane, L., Fernández-Tornero, C., and Zhou, M. (2011). ScienceDirect.com - Structure - Mass Spectrometry Reveals Stable Modules in holo and apo RNA Polymerases I and III. *Structure* 19, 90–100.

Larminie, C.G., Cairns, C.A., Mital, R., Martin, K., Kouzarides, T., Jackson, S.P., and White, R.J. (1997). Mechanistic analysis of RNA polymerase III regulation by the retinoblastoma

protein. *Embo J.* 16, 2061–2071.

Lassar, A.B., Martin, P.L., and Roeder, R.G. (1983). Transcription of class III genes: formation of preinitiation complexes. *Science* 222, 740–748.

Lefebvre, O., R uth, J., and 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, 23374–23381.

Leresche, A., Wolf, V.J., and Gottesfeld, J.M. (1996). Repression of RNA polymerase II and III transcription during M phase of the cell cycle. *Exp. Cell Res.* 229, 282–288.

Levinger, L., and Varshavsky, A. (1982). Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the *Drosophila* genome. *Cell* 28, 375–385.

Li, H., Byeon, I., and Ju, Y. (2004). ScienceDirect.com - Journal of Molecular Biology - Structure of Human Ki67 FHA Domain and its Binding to a Phosphoprotein Fragment from hNIFK Reveal Unique Recognition Sites and New Views to the Structural Basis of FHA Domain Functions. *J. Mol. Biol.* 335, 371–381.

Li, Q., Zhou, H., Wurtele, H., Davies, B., and Horazdovsky, B. (2008). ScienceDirect.com - Cell - Acetylation of Histone H3 Lysine 56 Regulates Replication-Coupled Nucleosome Assembly. *Cell* 134, 244–255.

Li, T. (2001). Differential stress induction of individual Alu loci: implications for transcription and retrotransposition. *Gene* 276, 135–141.

Li, X., Zhang, S., Blander, G., Tse, J.G., Krieger, M., and Guarente, L. (2007). SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol. Cell* 28, 91–106.

Lin, S.J., Defossez, P.A., and Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126–2128.

Lin, Y., Fletcher, C.M., Zhou, J., Allis, C.D., and Wagner, G. (1999). Solution structure of the catalytic domain of GCN5 histone acetyltransferase bound to coenzyme A. *Nature* 400, 86–89.

Linger, J.G., and Tyler, J.K. (2007). Chromatin disassembly and reassembly during DNA repair. *Mutat. Res.* 618, 52–64.

Liszt, G., Ford, E., Kurtev, M., and Guarente, L. (2005). Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 280, 21313–21320.

Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D., and Berger, S.L. (1999). p53 Sites Acetylated In Vitro by PCAF and p300 Are Acetylated In Vivo in Response to DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.*, 19(2):1202.

Liu, W.M., Chu, W.M., Choudary, P.V., and Schmid, C.W. (1995). Cell stress and translational inhibitors transiently increase the abundance of mammalian SINE transcripts. *Nucleic Acids Res.* 23, 1758–1765.

Lobo, S., Tanaka, M., and Sullivan, M. (1992a). 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*, 1029-1040.
- Lobo, S.M., Tanaka, M., Sullivan, M.L., and Hernandez, N. (1992b). 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*, 1029-1040.
- Lorenzen, K., Vannini, A., Cramer, P., and Heck, A.J.R. (2007). Structural biology of RNA polymerase III: mass spectrometry elucidates subcomplex architecture. *Structure* *15*, 1237-1245.
- Loyola, A., and Almouzni, G. (2004). Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim. Biophys. Acta* *1677*, 3-11.
- Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., and Imhof, A. (2006). ScienceDirect.com - Molecular Cell - PTMs on H3 Variants before Chromatin Assembly Potentiate Their Final Epigenetic State. *Mol. Cell*.
- Ludérus, M.E., van Steensel, B., Chong, L., Sibon, O.C., Cremers, F.F., and de Lange, T. (1996). Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J. Cell Biol.* *135*, 867-881.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251-260.
- Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* *107*, 137-148.
- LYON, M.F. (1962). Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* *14*, 135-148.
- Mahy, N.L., Perry, P.E., and Bickmore, W.A. (2002). Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH. *J. Cell Biol.* *159*, 753-763.
- Manaud, N., Arrebola, R., Buffin-Meyer, B., Lefebvre, O., Voss, H., Riva, M., Conesa, C., and Sentenac, A. (1998). A chimeric subunit of yeast transcription factor III C forms a subcomplex with tau95. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 3191-3200.
- Margottin, F., Dujardin, G., Gérard, M., Egly, J.M., Huet, J., and Sentenac, A. (1991). Participation of the TATA factor in transcription of the yeast U6 gene by RNA polymerase C. *Science* *251*, 424-426.
- Marsden, M.P., and Laemmli, U.K. (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* *17*, 849-858.
- Martin, C., and Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 838-849.
- Martinez-Balbás, M.A., Bannister, A.J., Martin, K., Haus-Seuffert, P., Meisterernst, M., and Kouzarides, T. (1998). The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *Embo J.*

17, 2886–2893.

Martzen, M.R., McCraith, S.M., Spinelli, S.L., Torres, F.M., Fields, S., Grayhack, E.J., and Phizicky, E.M. (1999). A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* 286, 1153–1155.

Marzouki, N., Camier, S., Ruet, A., Moenne, A., and Sentenac, A. (1986). Selective proteolysis defines two DNA binding domains in yeast transcription factor tau. *Nature* 323, 176–178.

Masumoto, H., Hawke, D., Kobayashi, R., and Verreault, A. (2005). A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature* 436, 294–298.

Matsutani, S. (2004). Similarities in transcription factor IIIC subunits that bind to the posterior regions of internal promoters for RNA polymerase III. *BMC Evol. Biol.* 4, 26–.

Matsuzaki, H., Kassavetis, G.A., and Geiduschek, E.P. (1994). Analysis of RNA chain elongation and termination by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III. *Journal of Molecular Biology* 235, 1173–1192.

McCulloch, V., Hardin, P., Peng, W., Ruppert, J., and Lobo-Ruppert, S. (2000). Alternatively spliced hBRF variants function at different RNA polymerase III promoters. *Embo. J.* 4134–4143.

Meka, H., Daoust, G., Arnvig, K.B., Werner, F., Brick, P., and Onesti, S. (2003). Structural and functional homology between the RNAPI subunits A14/A43 and the archaeal RNAP subunits E/F. *Nucleic Acids Research*, 31, 15.

Meneghini, M.D., Wu, M., and Madhani, H.D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 112, 725–736.

Méjat, A., Ramond, F., Bassel-Duby, R., Khochbin, S., Olson, E.N., and Schaeffer, L. (2005). Histone deacetylase 9 couples neuronal activity to muscle chromatin acetylation and gene expression. *Nat Neurosci* 8, 313–321.

Michan, S., and Sinclair, D. (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem. J.* 404, 1–13.

Michishita, E., McCord, R.A., Berber, E., Kioi, M., Padilla-Nash, H., Damian, M., Cheung, P., Kusumoto, R., Kawahara, T.L.A., Barrett, J.C., et al. (2008). SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* 452, 492–496.

Michishita, E., Park, J.Y., Burneskis, J.M., Barrett, J.C., and Horikawa, I. (2005). Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol. Biol. Cell* 16, 4623–4635.

Milne, J.C., Lambert, P.D., Schenk, S., Carney, D.P., Smith, J.J., Gagne, D.J., Jin, L., Boss, O., Perni, R.B., Vu, C.B., et al. (2007). Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450, 712–716.

Miska, E.A. (1999). HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2

transcription factor. *Embo J.* 18, 5099–5107.

Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L., Kouzarides, T., et al. (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87, 1261–1270.

Moir, R., and WILLIS, I. (2004). Tetratricopeptide Repeats of Tfc4 and a Limiting Step in the Assembly of the Initiation Factor TFIIB. *Advances in Protein Chemistry* 67, 93–121.

Moir, R.D., Lee, J., Haeusler, R.A., Desai, N., Engelke, D.R., and Willis, I.M. (2006). Protein kinase A regulates RNA polymerase III transcription through the nuclear localization of Maf1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 15044–15049.

Molenaar, C., Wiesmeijer, K., Verwoerd, N.P., Khazen, S., Eils, R., Tanke, H.J., and Dirks, R.W. (2003). Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes. *Embo J.* 22, 6631–6641.

Mostoslavsky, R., Chua, K.F., Lombard, D.B., Pang, W.W., Fischer, M.R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M.M., et al. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124, 315–329.

Moynihan, K.A., Grimm, A.A., Plueger, M.M., Bernal-Mizrachi, E., Ford, E., Cras-Méneur, C., Permutt, M.A., and Imai, S.-I. (2005). Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metabolism* 2, 105–117.

Muchardt, C., Reyes, J.C., Bourachot, B., Leguoy, E., and Yaniv, M. (1996). The hbrm and BRG-1 proteins, components of the human SNF/SWI complex, are phosphorylated and excluded from the condensed chromosomes during mitosis. *Embo J.* 15, 3394–3402.

Murata, K., Hattori, M., Hirai, N., Shinozuka, Y., Hirata, H., Kageyama, R., Sakai, T., and Minato, N. (2005). Hes1 Directly Controls Cell Proliferation through the Transcriptional Repression of p27Kip1. *Mol. Cell. Biol.* 25(10):4262.

Murphy, S., Tripodi, M., and Melli, M. (1986). A sequence upstream from the coding region is required for the transcription of the 7SK RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 14, 9243–9260.

Muth, V., Nadaud, S., Grummt, I., and Voit, R. (2001). Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription. *Embo J.* 20, 1353–1362.

Mylona, A., Fernández-Tornero, C., Legrand, P., Haupt, M., Sentenac, A., Acker, J., and Müller, C.W. (2006). Structure of tau 60/Delta tau 91 subcomplex of yeast transcription factor IIIC: Insights into preinitiation complex assembly. *Mol. Cell* 24, 221–232.

Nahas, F., Dryden, S.C., Abrams, J., and Tainsky, M.A. (2007). Mutations in SIRT2 deacetylase which regulate enzymatic activity but not its interaction with HDAC6 and tubulin. *Mol. Cell. Biochem.* 303, 221–230.

Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R.V., McCurrach, M.E., Jacobson, M.D., Narita, M., Zhang, M.Q., Lazebnik, Y., Bar-Sagi, D., and Lowe, S.W. (2002). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat. Cell Biol.* 4, 859–864.

Nakamura, Y., Ogura, M., Tanaka, D., and Inagaki, N. (2008). Localization of mouse

- mitochondrial SIRT proteins: shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *366*, 174–179.
- Nakayama, K., Sudo, Y., Sasaki, Y., Iwata, H., Takahashi, M., and Kamataki, T. (2001). Studies on transcriptional regulation of Cyp3a16 gene in mouse livers by application of direct DNA injection method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *287*, 820–824.
- Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D.E., Bylebyl, G.R., Dokmanovic, M., Dorsey, J.A., Whelan, K.A., Krsmanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P.B., et al. (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes & Development* *20*, 966–976.
- Nemoto, S., Fergusson, M.M., and Finkel, T. (2004). Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* *306*, 2105–2108.
- Nickel, B., and Allis, C. (1989). Ubiquitinated histone H2B is preferentially located in transcriptionally active chromatin - American Chemical Society. *Vol. 28, No. 3*.
- Nicolas, E., Morales, V., Magnaghi-Jaulin, L., Harel-Bellan, A., Richard-Foy, H., and Trouche, D. (2000). RbAp48 belongs to the histone deacetylase complex that associates with the retinoblastoma protein. *J. Biol. Chem.* *275*, 9797–9804.
- Nisoli, E., Tonello, C., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Falcone, S., Valerio, A., Cantoni, O., Clementi, E., et al. (2005). Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* *310*, 314–317.
- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K., and Milburn, M.V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* *395*, 137–143.
- Noma K, Allis, C.D., and Grewal, S.I. (2001). Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* *293*, 1150–1155.
- Noma, K.-I., Cam, H.P., Maraia, R.J., and Grewal, S.I.S. (2006). A role for TFIIC transcription factor complex in genome organization. *Cell* *125*, 859–872.
- North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M., and Verdin, E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol. Cell* *11*, 437–444.
- Novello, F., and Stirpe, F. (1970). Simultaneous assay of RNA polymerase I and II in nuclei isolated from resting and growing rat liver with the use of alpha-amanitin. *FEBS Lett.* *8*, 57–60.
- Oficjalska-Pham, D., Harismendy, O., and Smagowicz, W. (2006). ScienceDirect.com - Molecular Cell - General Repression of RNA Polymerase III Transcription Is Triggered by Protein Phosphatase Type 2A-Mediated Dephosphorylation of Maf1. *Molecular Cell* *22*, 623–632.
- Okamoto, I., Otte, A.P., Allis, C.D., Reinberg, D., and Heard, E. (2004). Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* *303*, 644–649.
- Onyango, P., Celic, I., McCaffery, J.M., Boeke, J.D., and Feinberg, A.P. (2002). SIRT3, a

- human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 13653–13658.
- Oñate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* *270*, 1354–1357.
- Orgel, L.E., and Crick, F.H. (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* *284*, 604–607.
- Ornaghi, P., Ballario, P., Lena, A., and González, A. (1999). ScienceDirect.com - Journal of Molecular Biology - The bromodomain of Gcn5p interacts in vitro with specific residues in the N terminus of histone H4. *J. Mol. Biol.* *287*, 1-7.
- Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes & Development* *10*, 2657–2683.
- Osborne, C.S., Chakalova, L., Brown, K.E., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., Goyenechea, B., Mitchell, J.A., Lopes, S., Reik, W., et al. (2004). Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat. Genet.* *36*, 1065–1071.
- Ouararhni, K., Hadj-Slimane, R., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Mietton, F., Harel-Bellan, A., Dimitrov, S., and Hamiche, A. (2006). The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity. *Genes & Development* *20*, 3324–3336.
- Ouyang, C., Martinez, M.J., Young, L.S., and Sprague, K.U. (2000). TATA-Binding Protein–TATA Interaction Is a Key Determinant of Differential Transcription of Silkworm Constitutive and Silk Gland-Specific tRNAA_{ala} Genes. *Mol. Cell. Biol.*, *20*(4):1329.
- Paca, R.E., Ogert, R.A., Hibbert, C.S., Izaurralde, E., and Beemon, K.L. (2000). Rous Sarcoma Virus DR Posttranscriptional Elements Use a Novel RNA Export Pathway. *JOURNAL OF VIROLOGY*, p. 9507–9514
- Pagans, S., Pedal, A., North, B.J., Kaehlcke, K., Marshall, B.L., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Henklein, P., Frye, R., McBurney, M.W., et al. (2005). SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *PLoS Biol.* *3*, e41.
- Panteleeva, I., Rouaux, C., Larmet, Y., Boutillier, S., Loeffler, J.-P., and Boutillier, A.-L. (2004). HDAC-3 participates in the repression of e2f-dependent gene transcription in primary differentiated neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1030*, 656–660.
- Pasqualucci, L., Bereschenko, O., Niu, H., Klein, U., Basso, K., Guglielmino, R., Cattoretti, G., and Dalla-Favera, R. (2003). Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: the role of Bcl-6. *Leuk. Lymphoma* *44 Suppl 3*, S5–S12.
- Pasquinelli, A., Powers, M., and Lund, E. (1997). Inhibition of mRNA export in vertebrate cells by nuclear export signal conjugates. *PNAS.* *94*, 14394-14399.
- Paule, M.R., and White, R.J. (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* *28*, 1283–1298.
- Paweletz, N. (2001). Box 1 : Walther Flemming: pioneer of mitosis research : *Nature*

Reviews Molecular Cell Biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 72–75.

Pehrson, J.R., and Fried, V.A. (1992). MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257, 1398–1400.

Pelletier, G., Stefanovsky, V.Y., Faubladiet, M., Hirschler-Laszkiwicz, I., Savard, J., Rothblum, L.I., Côté, J., and Moss, T. (2000). Competitive recruitment of CBP and Rb-HDAC regulates UBF acetylation and ribosomal transcription. *Mol. Cell* 6, 1059–1066.

Perche, P.Y., Vourc'h, C., Konecny, L., Souchier, C., Robert-Nicoud, M., Dimitrov, S., and Khochbin, S. (2000). Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density. *Curr. Biol.* 10, 1531–1534.

Perrod, S. (2001). A cytosolic NAD-dependent deacetylase, Hst2p, can modulate nucleolar and telomeric silencing in yeast. *Embo J.* 20, 197–209.

Perry, C.A., Allis, C.D., and Annunziato, A.T. (1993). Parental nucleosomes segregated to newly replicated chromatin are underacetylated relative to those assembled de novo. *Biochemistry* 32, 13615–13623.

Peterson, C.L., and Côté, J. (2004). Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes & Development* 18, 602–616.

Peyroche, G., Levillain, E., Siaut, M., Callebaut, I., Schultz, P., Sentenac, A., Riva, M., and Carles, C. (2002). The A14-A43 heterodimer subunit in yeast RNA pol I and their relationship to Rpb4-Rpb7 pol II subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 14670–14675.

Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Machado De Oliveira, R., Leid, M., McBurney, M.W., and Guarente, L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429, 771–776.

Pluta, K., Lefebvre, O., Martin, N.C., Smagowicz, W.J., Stanford, D.R., Ellis, S.R., Hopper, A.K., Sentenac, A., and Boguta, M. (2001). Maf1p, a negative effector of RNA polymerase III in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5031–5040.

Poot, R.A., Bozhenok, L., van den Berg, D.L.C., Hawkes, N., and Varga-Weisz, P.D. (2005). Chromatin remodeling by WSTF-ISWI at the replication site: opening a window of opportunity for epigenetic inheritance? *Cell Cycle* 4, 543–546.

Prozorovski, T., Schulze-Toppf, U., Glumm, R., Baumgart, J., Schröter, F., Ninnemann, O., Siegert, E., Bendix, I., Brüstle, O., Nitsch, R., et al. (2008). Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nat. Cell Biol.* 10, 385–394.

Puri, P.L., Avantaggiati, M.L., Balsano, C., Sang, N., Graessmann, A., Giordano, A., and Levvero, M. (1997). p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. *Embo J.* 16, 369–383.

Pützer, B.M. (2007). E2F1 death pathways as targets for cancer therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 239–251.

Qin, W., Yang, T., Ho, L., Zhao, Z., Wang, J., Chen, L., Zhao, W., Thiagarajan, M., MacGrogan, D., Rodgers, J.T., et al. (2006). Neuronal SIRT1 activation as a novel

- mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J. Biol. Chem.* *281*, 21745–21754.
- Quentin, Y. (1992). Origin of the Alu family: a family of Alu-like monomers gave birth to the left and the right arms of the Alu elements. *Nucleic Acids Res.* *20*, 3397–3401.
- Ransom, M., Dennehey, B.K., and Tyler, J.K. (2010). Chaperoning histones during DNA replication and repair. *Cell* *140*, 183–195.
- Rao, B.J., Brahmachari, S.K., and Rao, M.R. (1983). Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. *J. Biol. Chem.* *258*, 13478–13485.
- Raska, I. (2003). Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol.* *13*, 517–525.
- Rathbone, C.R., Booth, F.W., and Lees, S.J. (2009). Sirt1 increases skeletal muscle precursor cell proliferation. *Eur. J. Cell Biol.* *88*, 35–44.
- Reina, J.H., Azzouz, T.N., and Hernandez, N. (2006). Maf1, a new player in the regulation of human RNA polymerase III transcription. *PLoS ONE* *1*, e134.
- Richmond, T.J., and Davey, C.A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* *423*, 145–150.
- Roberts, D.N., Stewart, A.J., Huff, J.T., and Cairns, B.R. (2003). The RNA polymerase III transcriptome revealed by genome-wide localization and activity-occupancy relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 14695–14700.
- Rodgers, J.T., and Puigserver, P. (2007). Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 12861–12866.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* *434*, 113–118.
- Roeder, R.G., and Rutter, W.J. (1969). Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature* *224*, 234–237.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* *273*, 5858–5868.
- Rogina, B., and Helfand, S.L. (2004). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 15998–16003.
- Rothfels, K., Rowland, O., and 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*, 4869–4881.
- Rowold, D.J., and Herrera, R.J. (2000). Alu elements and the human genome. *Genetica* *108*, 57–72.

- Ruet, A., Camier, S., Smagowicz, W., Sentenac, A., and Fromageot, P. (1984). Isolation of a class C transcription factor which forms a stable complex with tRNA genes. *Embo J.* *3*, 343–350.
- Rüth, J., Conesa, C., Dieci, G., Lefebvre, O., Düsterhöft, A., Ottonello, S., and Sentenac, A. (1996). A suppressor of mutations in the class III transcription system encodes a component of yeast TFIIB. *Embo J.* *15*, 1941–1949.
- Sablina, A.A., Budanov, A.V., Ilyinskaya, G.V., Agapova, L.S., Kravchenko, J.E., and Chumakov, P.M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* *11*, 1306–1313.
- Sadhale, P.P., and Woychik, N.A. (1994). C25, an essential RNA polymerase III subunit related to the RNA polymerase II subunit RPB7. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 6164–6170.
- Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., and Horio, Y. (2004). Predominant expression of Sir2alpha, an NAD-dependent histone deacetylase, in the embryonic mouse heart and brain. *FEBS Lett.* *556*, 281–286.
- Sakonju, S., Bogenhagen, D.F., and Brown, D.D. (1980). A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: I. The 5' border of the region. *Cell* *19*, 13–25.
- Sakonju, S., Brown, D.D., Engelke, D., Ng, S.Y., Shastry, B.S., and Roeder, R.G. (1981). The binding of a transcription factor to deletion mutants of a 5S ribosomal RNA gene. *Cell* *23*, 665–669.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C.T., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* *419*, 407–411.
- Sartorelli, V., Puri, P.L., Hamamori, Y., Ogryzko, V., Chung, G., Nakatani, Y., Wang, J.Y., and Kedes, L. (1999). Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Mol. Cell* *4*, 725–734.
- Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* *296*, 2176–2178.
- Scher, M.B., Vaquero, A., and Reinberg, D. (2007). SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes & Development* *21*, 920–928.
- Schmid, C.W. (1998). Does SINE evolution preclude Alu function? *Nucleic Acids Research.* *20*, 4541–4550.
- Schneider, R., Bannister, A.J., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C., and Kouzarides, T. (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat. Cell Biol.* *6*, 73–77.
- Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* *182*, 311–322.

- Schramm, L., and Hernandez, N. (2002). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes & Development* 16, 2593–2620.
- Schramm, L., Pendergrast, P., Sun, Y., and Hernandez, N. (2000). Different human TFIIB activities direct RNA polymerase III transcription from TATA-containing and TATA-less promoters. *Genes & Development* 14, 2650–2663.
- Schroder, O., Bryant, G., Geiduschek, E., Berk, A., and Kassavetis, G. (2003). A common site on TBP for transcription by RNA polymerases II and III. *Embo J.* 22, 5115–5124.
- Schultz, J. (1936). Variegation in *Drosophila* and the Inert Chromosome Regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 22, 27–33.
- Schübeler, D., Scalzo, D., Kooperberg, C., van Steensel, B., Delrow, J., and Groudine, M. (2002). Genome-wide DNA replication profile for *Drosophila melanogaster*: a link between transcription and replication timing. *Nat. Genet.* 32, 438–442.
- Schwartz, B.E., and Ahmad, K. (2005). Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes & Development* 19, 804–814.
- Schwer, B. (2008). Conserved Metabolic Regulatory Functions of Sirtuins. *Cell Metabolism* 7, 104–112.
- Schwer, B., Bunkenborg, J., Verdin, R.O., Andersen, J.S., and Verdin, E. (2006). Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 103, 10224–10229.
- Schwer, B., North, B.J., Frye, R.A., Ott, M., and Verdin, E. (2002). The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J. Cell Biol.* 158, 647–657.
- Scott, P.H., Cairns, C.A., Sutcliffe, J.E., Alzuherri, H.M., McLees, A., Winter, A.G., and White, R.J. (2001). Regulation of RNA polymerase III transcription during cell cycle entry. *J. Biol. Chem.* 276, 1005–1014.
- Segall, J., Matsui, T., and Roeder, R.G. (1980). Multiple factors are required for the accurate transcription of purified genes by RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* 255, 11986–11991.
- Senawong, T., Peterson, V.J., and Leid, M. (2005). BCL11A-dependent recruitment of SIRT1 to a promoter template in mammalian cells results in histone deacetylation and transcriptional repression. *Arch. Biochem. Biophys.* 434, 316–325.
- Senawong, T., Peterson, V.J., Avram, D., Shepherd, D.M., Frye, R.A., Minucci, S., and Leid, M. (2003). Involvement of the histone deacetylase SIRT1 in chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF)-interacting protein 2-mediated transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* 278, 43041–43050.
- Sengupta, N., and Seto, E. (2004). Regulation of histone deacetylase activities. *J. Cell. Biochem.* 93, 57–67.
- Sentenac, A. (1985). Eukaryotic RNA polymerases. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 18, 31–90.

- Shaw, P.J., and Jordan, E.G. (1995). The nucleolus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *11*, 93–121.
- Shen, Y., Igo, M., Yalamanchili, P., Berk, A., and DASGUPTA, A. (1996). DNA binding domain and subunit interactions of transcription factor IIIC revealed by dissection with poliovirus 3C protease. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4163–4171.
- Shiio, Y., and Eisenman, R.N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 13225–13230.
- Shogren-Knaak, M., and Peterson, C.L. (2006). Switching on chromatin: mechanistic role of histone H4-K16 acetylation. *Cc* *5*, 1361–1365.
- Shpakovski, G.V., and Shematorova, E.K. (1999). Rpc19 and Rpc40, two alpha-like subunits shared by nuclear RNA polymerases I and III, are interchangeable between the fission and budding yeasts. *Curr. Genet.* *36*, 208–214.
- Shuaib, M., Ouararhni, K., Dimitrov, S., and Hamiche, A. (2010). HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 1349–1354.
- Siaut, M., Zaros, C., Levivier, E., Ferri, M.-L., Court, M., Werner, M., Callebaut, I., Thuriaux, P., Sentenac, A., and Conesa, C. (2003). An Rpb4/Rpb7-like complex in yeast RNA polymerase III contains the orthologue of mammalian CGRP-RCP. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 195–205.
- Sif, S., Stukenberg, P.T., Kirschner, M.W., and Kingston, R.E. (1998). Mitotic inactivation of a human SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Genes & Development* *12*, 2842–2851.
- Simmen, K.A., Bernués, J., Lewis, J.D., and Mattaj, I.W. (1992). Cofractionation of the TATA-binding protein with the RNA polymerase III transcription factor TFIIIB. *Nucleic Acids Res.* *20*, 5889–5898.
- Sims, R.J., Chen, C.-F., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T., Patel, S.S., and Reinberg, D. (2005). Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J. Biol. Chem.* *280*, 41789–41792.
- Sinnett, D., Richer, C., Deragon, J.M., and Labuda, D. (1991). Alu RNA secondary structure consists of two independent 7 SL RNA-like folding units. *J. Biol. Chem.* *266*, 8675–8678.
- Sogo, J.M., Stahl, H., Koller, T., and Knippers, R. (1986). Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures. *Journal of Molecular Biology* *189*, 189–204.
- Soragni, E., and Kassavetis, G.A. (2008). Absolute gene occupancies by RNA polymerase III, TFIIIB, and TFIIIC in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *283*, 26568–26576.
- Southwood, C.M., Peppi, M., Dryden, S., Tainsky, M.A., and Gow, A. (2007). Microtubule deacetylases, SirT2 and HDAC6, in the nervous system. *Neurochem. Res.* *32*, 187–195.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Oñate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., et al. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* *389*, 194–198.

- Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 435–459.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41–45.
- Sugita, K. (1992). A Novel Tetracyclic Peptide, Trapoxin, Induces Phenotypic Change from Transformed to Normal in sis-Oncogene-transformed NIH3T3 Cells. *J. Cancer Res.* *83*, 324-328.
- Sun, C., Zhang, F., Ge, X., Yan, T., Chen, X., Shi, X., and Zhai, Q. (2007). SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metabolism* *6*, 307–319.
- Sun, Z.-W., and Allis, C.D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* *418*, 104–108.
- Sung, J.-Y., Kim, R., Kim, J.-E., and Lee, J. (2010). Balance between SIRT1 and DBC1 expression is lost in breast cancer. *Cancer Sci.* *101*, 1738–1744.
- Sutcliffe, J.E., Cairns, C.A., McLees, A., Allison, S.J., Tosh, K., and White, R.J. (1999). RNA polymerase III transcription factor IIIB is a target for repression by pocket proteins p107 and p130. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 4255–4261.
- Suwa, M., Nakano, H., Radak, Z., and Kumagai, S. (2008). Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle. *Metab. Clin. Exp.* *57*, 986–998.
- Swergold, G.D. (1990). Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 6718–6729.
- Syntichaki, P., Topalidou, I., and Thireos, G. (2000). The Gcn5 bromodomain co-ordinates nucleosome remodelling. *Nature* *404*, 414–417.
- Taddei, A., Hediger, F., and Neumann, F. (2004). THE FUNCTION OF NUCLEAR ARCHITECTURE: A Genetic Approach - *Annual Review of Genetics*, *38*(1):305.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* *116*, 51–61.
- Taggart, A.K., Fisher, T.S., and Pugh, B.F. (1992). The TATA-binding protein and associated factors are components of pol III transcription factor TFIIB. *Cell* *71*, 1015–1028.
- Takata, T. (2003). Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *301*, 250–257.
- Taunton, J., and Collins, J. (1996). Synthesis of Natural and Modified Trapoxins, Useful Reagents for Exploring Histone Deacetylase Function - *J. Am. Chem. Soc.* *118*, 10412-10422.

- Tchénio, T., Casella, J.F., and Heidmann, T. (2000). Members of the SRY family regulate the human LINE retrotransposons. *Nucleic Acids Res.* 28, 411–415.
- Teichmann, M., and Seifart, K.H. (1995). Physical separation of two different forms of human TFIIB active in the transcription of the U6 or the VAI gene in vitro. *Embo J.* 14, 5974–5983.
- Teichmann, M., Dieci, G., Huet, J., R uth, J., Sentenac, A., and Seifart, K.H. (1997). Functional interchangeability of TFIIB components from yeast and human cells in vitro. *Embo J.* 16, 4708–4716.
- Teichmann, M., Dieci, G., Pascali, C., and Boldina, G. (2010). General transcription factors and subunits of RNA polymerase III: Paralogs for promoter- and cell type-specific transcription in multicellular eukaryotes. *Transcription* 1, 130–135.
- Teichmann, M., Wang, Z., and Roeder, R. (2000). A stable complex of a novel transcription factor IIB-related factor, human TFIIB50, and associated proteins mediate selective transcription by RNA polymerase III of genes with upstream promoter elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 14200–14205.
- Thiriet, C., and Hayes, J.J. (2005). Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Mol. Cell* 18, 617–622.
- Thuillier, V., Stettler, S., Sentenac, A., Thuriaux, P., and Werner, M. (1995). A mutation in the C31 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III affects transcription initiation. *Embo J.* 14, 351–359.
- Tissenbaum, H.A., and Guarente, L. (2001). Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410, 227–230.
- T oth, K., Brun, N., and Langowski, J. (2006). Chromatin compaction at the mononucleosome level. *Biochemistry* 45, 1591–1598.
- Tremethick, D.J. (2007). Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell* 128, 651–654.
- Trojer, P., and Reinberg, D. (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol. Cell* 28, 1–13.
- Tsubota, T., Berndsen, C., Erkmann, J., and Smith, C. (2007). ScienceDirect.com - Molecular Cell - Histone H3-K56 Acetylation Is Catalyzed by Histone Chaperone-Dependent Complexes. *Mol. Cell*.
- Upadhyaya, R., and Lee, J. (2002). Maf1 Is an Essential Mediator of Diverse Signals that Repress RNA Polymerase III Transcription. *Molecular cell.* 10, 1489-1494.
- Usheva, A., and Shenk, T. (1994). TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. *Cell* 76, 1115–1121.
- Vakhrusheva, O., Braeuer, D., Liu, Z., Braun, T., and Bober, E. (2008). Sirt7-dependent inhibition of cell growth and proliferation might be instrumental to mediate tissue integrity during aging. *J. Physiol. Pharmacol.* 59 Suppl 9, 201–212.

- van Roijen, H.J., Ooms, M.P., Spaargaren, M.C., Baarends, W.M., Weber, R.F., Grootegoed, J.A., and Vreeburg, J.T. (1998). Immunoexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Hum. Reprod.* *13*, 1559–1566.
- Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004). Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol. Cell* *16*, 93–105.
- Vaquero, A., Scher, M.B., Lee, D.H., Sutton, A., Cheng, H.-L., Alt, F.W., Serrano, L., Sternglanz, R., and Reinberg, D. (2006). SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes & Development* *20*, 1256–1261.
- Vaziri, H., Dessain, S.K., Ng Eaton, E., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L., and Weinberg, R.A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* *107*, 149–159.
- Vidal, M., and Gaber, R.F. (1991). RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 6317–6327.
- Waddington, C. (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature.* *3811*, 563-565.
- Wade, P.A. (2001). Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 693–698.
- Wales, M.M., Biel, M.A., Deiry, el, W., Nelkin, B.D., Issa, J.P., Cavenee, W.K., Kuerbitz, S.J., and Baylin, S.B. (1995). p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat. Med.* *1*, 570–577.
- Waltzer, L., and Bienz, M. (1998). *Drosophila* CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature* *395*, 521–525.
- Wang, C., Chen, L., Hou, X., Li, Z., Kabra, N., Ma, Y., Nemoto, S., Finkel, T., Gu, W., Cress, W.D., et al. (2006). Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1025–1031.
- Wang, Z., and 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*, 7026–7030.
- Wang, Z., and Roeder, R.G. (1997). Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. *Genes & Development* *11*, 1315–1326.
- Wang, Z., Luo, T., and Roeder, R.G. (1997). Identification of an autonomously initiating RNA polymerase III holoenzyme containing a novel factor that is selectively inactivated during protein synthesis inhibition. *Genes & Development* *11*, 2371–2382.
- Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953). THE STRUCTURE OF DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* *18*, 123–131.

- Wei, W., Gilbert, N., Ooi, S.L., Lawler, J.F., Ostertag, E.M., Kazazian, H.H., Boeke, J.D., and Moran, J.V. (2001). Human L1 Retrotransposition: cisPreference versus trans Complementation. *Mol. Cell. Biol.* 21(4):1429.
- Weiner, A.M. (2002). SINEs and LINEs: the art of biting the hand that feeds you. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 343–350.
- Weiss, S.B., and Gladstone, L. (1959). A MAMMALIAN SYSTEM FOR THE INCORPORATION OF CYTIDINE TRIPHOSPHATE INTO RIBONUCLEIC ACID. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 4118–4119.
- Werner, M., Chaussivert, N., Willis, I.M., and Sentenac, A. (1993). Interaction between a complex of RNA polymerase III subunits and the 70-kDa component of transcription factor IIIB. *J. Biol. Chem.* 268, 20721–20724.
- Werner, M., Hermann-Le Denmat, S., Treich, I., Sentenac, A., and Thuriaux, P. (1992). Effect of mutations in a zinc-binding domain of yeast RNA polymerase C (III) on enzyme function and subunit association. *Mol. Cell. Biol.* 12, 1087–1095.
- Weser, S., Gruber, C., Hafner, H.M., Teichmann, M., Roeder, R.G., Seifart, K.H., and Meissner, W. (2004). Transcription factor (TF)-like nuclear regulator, the 250-kDa form of Homo sapiens TFIIB", is an essential component of human TFIIC1 activity. *J. Biol. Chem.* 279, 27022–27029.
- White, R.J., and Jackson, S.P. (1992). Mechanism of TATA-binding protein recruitment to a TATA-less class III promoter. *Cell* 71, 1041–1053.
- White, R.J., Gottlieb, T.M., Downes, C.S., and Jackson, S.P. (1995). Cell cycle regulation of RNA polymerase III transcription. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6653–6662.
- WILLIS, I. (1993). RNA polymerase III. *European Journal of Biochemistry.* 212, 1-11.
- WILLIS, I., and Desai, N. (2004). Signaling repression of transcription by RNA polymerase III in yeast. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 77, 323-53.
- Winkler, D.D., and Luger, K. (2011). The histone chaperone FACT: structural insights and mechanisms for nucleosome reorganization. *J. Biol. Chem.* 286, 18369–18374.
- Witt, O., Albig, W., and Doenecke, D. (1996). Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp. Cell Res.* 229, 301–306.
- Woodcock, D.M., Williamson, M.R., and Doherty, J.P. (1996). A sensitive RNase protection assay to detect transcripts from potentially functional human endogenous L1 retrotransposons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 460–465.
- Woodfine, K., Fiegler, H., Beare, D.M., Collins, J.E., McCann, O.T., Young, B.D., Debernardi, S., Mott, R., Dunham, I., and Carter, N.P. (2004). Replication timing of the human genome. *Human Molecular Genetics*, 13, 191-202.
- Workman, J.L., and Kingston, R.E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 545–579.

- Xu, W., Edmondson, D.G., and Roth, S.Y. (1998). Mammalian GCN5 and P/CAF Acetyltransferases Have Homologous Amino-Terminal Domains Important for Recognition of Nucleosomal Substrates.
- Xue, Y., Canman, J.C., Lee, C.S., Nie, Z., Yang, D., Moreno, G.T., Young, M.K., Salmon, E.D., and Wang, W. (2000). The human SWI/SNF-B chromatin-remodeling complex is related to yeast rsc and localizes at kinetochores of mitotic chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *97*, 13015–13020.
- Yamamoto, Y., Verma, U.N., Prajapati, S., Kwak, Y.-T., and Gaynor, R.B. (2003). Histone H3 phosphorylation by IKK- α is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* *423*, 655–659.
- Yang, N., Zhang, L., Zhang, Y., and Kazazian, H.H. (2003). An important role for RUNX3 in human L1 transcription and retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* *31*, 4929–4940.
- Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* *382*, 319–324.
- Yang, Y., Fu, W., Chen, J., Olashaw, N., Zhang, X., Nicosia, S.V., Bhalla, K., and Bai, W. (2007). SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1253–1262.
- Yao, Y.L., Yang, W.M., and Seto, E. (2001). Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 5979–5991.
- Yeung, F., Hoberg, J.E., Ramsey, C.S., Keller, M.D., Jones, D.R., Frye, R.A., and Mayo, M.W. (2004). Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *Embo J.* *23*, 2369–2380.
- YOSHINAGA, S., BOULANGER, P., and Berk, A. (1987). Resolution of Human Transcription Factor Tfiic Into 2 Functional Components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *84*, 3585–3589.
- Yu, J., and Auwerx, J. (2009). The Role of Sirtuins in the Control of Metabolic Homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1173*, E10–E19.
- Yuan, C.-C., Zhao, X., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., and Hernandez, N. (2007). CHD8 associates with human Staf and contributes to efficient U6 RNA polymerase III transcription. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 8729–8738.
- Yukawa, Y., Sugita, M., Choisne, N., Small, I., and Sugiura, M. (2000). The TATA motif, the CAA motif and the poly(T) transcription termination motif are all important for transcription re-initiation on plant tRNA genes. *Plant J.* *22*, 439–447.
- Zaros, C., and Thuriaux, P. (2005). Rpc25, a conserved RNA polymerase III subunit, is critical for transcription initiation. *Mol. Microbiol.* *55*, 104–114.
- Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., and Darst, S.A. (1999). Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* *98*, 811–824.

Zhang, W., and Bieker, J.J. (1998). Acetylation and modulation of erythroid Krüppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 95, 9855–9860.

Zhao, X., Pendergrast, P.S., and Hernandez, N. (2001). A positioned nucleosome on the human U6 promoter allows recruitment of SNAPc by the Oct-1 POU domain. *Mol. Cell* 7, 539–549.

Zhao, X., Sternsdorf, T., Bolger, T.A., Evans, R.M., and Yao, T.-P. (2005). Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8456–8464.

Julien OURY



Régulation épigénétique de la machinerie de transcription de l'ARN polymérase III par l'Histone Déacétylase SIRT1



SIRT1, appartenant à la famille des sirtuines, est une déacétylase NAD-dépendante, jouant un rôle essentiel dans le contrôle de l'expression génique. En plus de modifier les histones, SIRT1 peut affecter l'activité de certains facteurs de transcription et leurs gènes cibles. Une question fondamentale est de comprendre le mécanisme moléculaire par lequel SIRT1 contrôle l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et le métabolisme énergétique. Pour identifier les partenaires protéiques de SIRT1, nous avons utilisé la méthode de purification TAP-TAG à partir d'une fraction nucléaire soluble et d'une fraction ancrée à la chromatine de cellules Mef exprimant stablement une copie ectopique de SIRT1 (e-SIRT1). Nous avons ainsi pu identifier un complexe SIRT1 associé à la fois au facteur de prolifération cellulaire Ki67, et à la sous-unité TFIIC, nécessaire à l'assemblage du complexe de pré-initiation de l'ARN Polymérase III. En délétant *sirt1*, et en inhibant spécifiquement l'expression de Ki67, nous avons montré que la machinerie de transcription de l'ARN Polymérase III et la prolifération cellulaire étaient fortement affectées. L'ensemble de mes résultats démontre très clairement que SIRT1, Ki67, et TFIIC sont au sein d'un même complexe protéique, SIRT1 et Ki67 agissant de manière coordonnée pour réguler le niveau d'expression des SINES et des LINES, transcrits issus de la machinerie de transcription de l'ARN Polymérase III.

Mots clés: Transcription, SIRT1, Ki67, TFIIC, SINE, LINE

SIRT1, member of the sirtuins family, is an NAD-dependent deacetylase, playing an essential role in controlling gene expression. In addition to modifying histones, SIRT1 can affect the activity of several transcription factors and their target genes. A fundamental question is to understand the molecular mechanisms by which SIRT1 controls the expression of genes involved in cell proliferation and energy metabolism. To identify protein partners of SIRT1, we used the method of TAP-TAG purification from a soluble nuclear fraction and a chromatin anchored fraction of Mef cells stably expressing ectopic copy of SIRT1 (SIRT1-e). We were able to identify a SIRT1 complex associated with both cell proliferation factor Ki67, and TFIIC, subunit required for assembly of the RNA polymerase III pre-initiation complex. By deleting *Sirt1*, and by specifically inhibiting Ki67 expression, we showed that the RNA Polymerase III transcription machinery and cell proliferation were strongly affected. All of my results clearly shows that SIRT1, Ki67, and TFIIC are within a same protein complex, SIRT1 and Ki67, acting in coordination to regulate the expression level of SINES and LINES, transcribed from RNA polymerase III transcription machinery.

Key words: Transcription, SIRT1,