



HAL
open science

Rôles de TFIIH dans l'ouverture du promoteur et le remodelage de la chromatine lors la transcription des gènes de classe II

Jérémy Sandoz

► **To cite this version:**

Jérémy Sandoz. Rôles de TFIIH dans l'ouverture du promoteur et le remodelage de la chromatine lors la transcription des gènes de classe II. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ027 . tel-02408585

HAL Id: tel-02408585

<https://theses.hal.science/tel-02408585>

Submitted on 13 Dec 2019

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 santé
IGBMC – CNRS – Inserm – Université de Strasbourg

THÈSE présentée par :
Jérémy Sandoz

soutenue le : **9 Septembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences du Vivant/Aspects Moléculaires et
Cellulaires de la Biologie

**Rôles de TFIIH dans l'ouverture du
promoteur et le remodelage de la chromatine
lors de la transcription des gènes de classe II**

THÈSE dirigée par :
Dr. COIN Frédéric

DR, IGBMC, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. GIGLIA-MARI Ambra

DR, Institut Neuromyogène, Université Claude
Bernard Lyon 1

Dr. CHYMKOWITCH Pierre

Group leader, Dept. of microbiology, Oslo
University Hospital, Norway

AUTRE MEMBRE DU JURY :

Dr DEVYS Didier

CR, IGBMC, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Dr. Ambra Giglia-Mari, Dr. Pierre Chymkowsytch et Dr. Didier Devys, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie bien sûr Dr. Frédéric Coin, sans qui je ne serais pas là où j'en suis maintenant. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire, j'ai appris et j'apprends encore beaucoup à vos côtés.

Je remercie la Fondation pour la Recherche Médicale pour avoir financé ma dernière année de thèse.

Merci aussi à tous les membres du laboratoire présents et passés : Annabel, Baptiste, Cathy, Carlos, Federico, François, Jean-Marc, Li-Chiao, Manu, Maryssa, Max, Nico, Philippe, Pietro, Sergey et Zita. Mention spéciale pour Philippe, mon acolyte de l'aventure. J'ai particulièrement apprécié travailler avec toi et merci pour les bons moments passés ensemble, pour nos discussions pas toujours scientifiques... et pour les glaces ! Mention spéciale aussi pour Zita. Tu m'as accompagné au début de ma thèse, tu as pris le temps de me former pour les techniques et je t'en remercie.

Place maintenant à mes autres acolytes de l'institut : Elise et Seb, je vous ai rencontré en master et maintenant vous faites partie de mes meilleurs amis. Vous avez été là pour moi tout au long de ma thèse, dans les moments de bonheur mais aussi dans des moments plus difficiles. Les soirées (un peu trop arrosées), les pauses déjeuner, les retraites, les potins, les fous rires, etc... resteront dans les très bons moments de ma thèse. Merci aussi aux deux Thomas, à nous 5 nous formions la meilleure team « get together ».

Je considère enfin que l'entourage en dehors du laboratoire est d'une importance capitale afin de réussir une thèse. C'est en partie grâce à eux que j'ai réussi à aller jusqu'au bout.

Coralie, t'avoir à mes côtés est une chance incroyable. On s'est soutenu mutuellement pour nos thèses respectives et avons avancé ensemble. Je repense à la fois où une personne de

ton équipe avait dit qu'une relation entre deux thésards ne pouvaient pas durer. Je crois que nous l'avons contredit. Merci pour tout !

Naturellement, je remercie du fond du cœur ma famille (papa, maman, ma sœur, mes frères et belles-sœurs, mon neveu et ma nièce) sans qui rien de tout cela n'aurait été possible, même si ma thèse restera une énigme pour eux. Je n'oublie bien évidemment pas les oncles, tantes, cousins, cousines...

Enfin je remercie mes amis, très importants pour moi : les bichons et bichettes bien sûr mais aussi Sandra, Xavier, Marine, Maxime, Camille, Laetitia, Pauline, Adrien...

A Maxime, mon meilleur ami parti trop tôt !

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	5
Liste des tableaux.....	7
Liste des figures	8
Abréviations.....	10
Introduction	13
1. Transcription des gènes de classe II.....	14
1.1. Le Promoteur.....	15
1.2. La machinerie transcriptionnelle	17
1.3. Cycle de la transcription	23
1.4. Régulation de la transcription.....	28
2. Le complexe TFIIH	41
2.1. Composition de TFIIH.....	41
2.2. Structure de TFIIH.....	43
2.3. Rôles de TFIIH dans la transcription	44
2.4. Drogues ciblant les activités de TFIIH.....	47
3. Le mécanisme NER	48
3.1. Les étapes successives de NER.....	49
3.2. Les maladies génétiques associées à un défaut de NER	53
3.3. Dualité des facteurs NER.....	57
4. La sous-unité XPB	59
4.1. Structure de XPB.....	59

4.2. Rôles de XPB	60
4.3. Mutations dans XPB.....	65
5. Questions posées au cours de la thèse.....	66
Résultats.....	68
Transcription without XPB establishes a unified helicase-independent mechanism of promoter opening in eukaryotic gene expression	69
Functional interplay between TFIIH and KAT2A regulates higher-order chromatin structure and class II gene expression.....	92
Conclusion	118
1. L'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur.....	119
2. XPB et le remodelage de la chromatine.....	123
3. Parallèles entre ces deux études	128
Références.....	130

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des différents CPE	16
Tableau 2 : Les différentes sous-unités de l'ARN polymérase II.....	17
Tableau 3 : Composition et fonctions des différents facteurs généraux de la transcription.....	22
Tableau 4 : Les différentes sous-unités de TFIIH et leurs fonctions	42
Tableau 5 : Caractéristiques phénotypiques des principales maladies génétiques de la réparation.....	56

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de plusieurs CPE sur un promoteur concentré d'un gène.....	16
Figure 2 : Structures cristallographiques par Cryo-EM de l'ARN polymérase II .	18
Figure 3 : Représentation schématique de l'initiation de la transcription	24
Figure 4 : Recyclage de Pol II grâce à la formation d'une boucle du gène.....	27
Figure 5 : Phosphorylation du CTD de Pol II durant l'initiation de la transcription, l'élongation et la terminaison d'un snoARN chez la levure.....	28
Figure 6 : Méthylation et déméthylation d'une cytosine	30
Figure 7 : Structures schématiques d'un nucléosome	31
Figure 8 : Les différents états de compaction de la chromatine	32
Figure 9 : Représentation non exhaustive de différentes marques post-traductionnelles des histones.....	33
Figure 10 : Réaction d'acétylation d'une lysine	34
Figure 11 : Les différents états de méthylation de la lysine et de l'arginine	36
Figure 12 : Représentation schématique d'une boucle de chromatine rapprochant des séquences régulatrices distales et le promoteur d'un gène...	39
Figure 13 : Représentation d'une boucle de chromatine.....	40
Figure 14 : Composition du complexe TFIIH	41
Figure 15 : Structures tridimensionnelles de TFIIH	44
Figure 16 : Rôle de TFIIH dans l'initiation de la transcription.....	45
Figure 17 : Les étapes successives du mécanisme de réparation par excision de nucléotides.....	50

Figure 18 : Les différentes maladies génétiques de la réparation.....	53
Figure 19 : Composition et structure cristallographique de XPB.....	60
Figure 20 : Structure cristallographique de XPB et schéma du changement de conformation grâce à l'utilisation de son activité ATPase.....	64

Abréviations

5caC	5-carboxylCytosine
5fC	5-formylCytosine
5hmC	5-hydroxymethylCytosine
5mC	5-methylCytosine
6-4PP	6-4 Pyrimidine Pyrimidone
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzyme A
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adenosine DiPhosphate
AR	Acide Rétinoïque
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm/r/t	ARN messenger/ribosomal/de transfert
ATAC	Ada Two A-Containing
ATP	Adenosine TriPhosphate
BER	Base Excision Repair
BET	Bromodomain and ExtraTerminal domain
BRD4	BRomoDomain containing 4
BRE	TFIIB Recognition Element
CAF1	Chromatin Assembly Factor 1
CAK	CDK-Activating Kinase
CBP	CREB-Binding Protein
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CETN2	Centrin 2
COFS	Cerebro-Oculo-Facio-Skeletal Syndrome
CPD	Cyclobutane-Pyrimidine Dimer
CPDD	CTCF-Pair-Define Domain
CPE	Core Promoter Element
CPSF	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor
CS	Cockayne Syndrome
CSA/B	Cockayne Syndrome complementation group A/B protein
CstF	Cleavage stimulatory Factor
CTCF	CCCTC-binding Factor
CTD	Carboxy-Terminal Domain
Cul4	Cullin 4
CYP26	Cytochrome P450 family 26
DCE	Downstream Core Element
DDB	DNA Damaged Binding protein
DNMT	DNA MethylTransferase
DPE	Downstream Promoter Element
DRB	5,6-Dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole
DRD	DNA damage Recognition Domain
DSIF	DRB Sensitivity Inducing Factor
E2F1	adenovirus E2 gene Factor 1
ERCC1-3	Excision Repair Cross-Complementation group 1-3
EU	5-Ethynyl Uridine
FEN1	Flap EndoNuclease 1

GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GCN5	General Control of Nutrition 5
GG-NER	Global-Genome NER
GNAT	GCN5-related N-Acetyl Transferase
GTF	General Transcription Factor
HAT	Histone Acetyltransferase
HD1-2	Helicase Domain 1-2
HDAC	Histone DeAcetylation
HMT	Histone Methyl Transferase
HP1	Heterochromatin Protein 1
HPTM	Histone Post-Translational Modification
HR23B	Homologue Rad 23 B
HSP	Heat Shock Protein
Inr	Initiator
iPS	induced Pluripotent Stem cells
KAT2A-B	Lysine (K) Acetyltransferase 2A-B
LacO/LacR	Lactose Operator/Lactose Repressor
LMR	Low Methylated Region
LRRC42	Leucine Rich Repeat Containing 42
MAT1	Ménage À Trois 1
MBD	Methyl CpG Binding Domain
Mfd	Mutation frequency decline
MTE	Motif Ten Element
MYST	MOF - Ybf2/Sas3 - Sas2 - Tip60
NAD+	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NELF	Negative Elongation Factor
NER	Nucleotide Excision Repair
NETO1	Neuropilin and Toll-like 1
NR	Nuclear Receptor
NTD	N-Terminal Domain
NTP	Nucleotide Triphosphate
PARG	PolyADP Ribose Glycohydrolase
PARP	PolyADP Ribose Polymerase
pb	paire de base
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PC4	Positive Cofactor 4
PCAF	P300/CBP Associated Factor
PGC1α	Peroxisome proliferator-activated receptor-Gamma Coactivator 1 α
PIC	PreInitiation Complex
Pol I-IV	ARN Polymérase I-IV
Pol ϵ-δ	ADN Polymérase ϵ - δ
P-TEFβ	Positive-Transcription Elongation Factor β
RARβ2	Retinoic Acid Receptor β 2
RBX1	Ring-Box 1
RFC	Replication Factor C
RNF130	Ring Finger protein 130
RPA	Replication Protein A
Rpb	RNA polymerase b

SAGA	Spt-Ada-GCN5 Acetyltransferase
SCF complex	Skp, Cullin, F-box containing Complex
Sen1	Senataxin 1
Ser	Serine
SF2	Superfamily 2
Sirt	Sirtuin
Skp	S-phase Kinase associated Protein
snoRNA	small nucleolar RNA
SP	Spironolactone
SUMO	Small Ubiquitin-like MOdifier
TAF	TBP-Associated Factor
TBP	TATA-Binding Protein
TC-NER	Transcription-Coupled NER
TDG	Thymine DNA Glycosylase
TET	Ten-Eleven Translocation
TF	Transcription Factor
TFIIA-H/S	Transcription Factor of Pol II A-H/S
ThM	Thumb
Thr	Threonine
TRCF	Transcription-Repair Coupling Factor
TSS	Transcription Start Site
TTD	TrichoThioDystrophy
TTDA	TrichoThioDystrophy A
Tyr	Tyrosine
USP7	Ubiquitin specific-processing protease 7
UV	Ultra-Violet
UVSS	UV-Sensitive Syndrome
vWF	von Willebrand Factor 1
XP	Xeroderma Pigmentosum
XPA-G	Xeroderma Pigmentosum group A-G/V
XRCC1	X ray Repair Cross Complementing 1
XRN2	5'-3' eXoRiboNuclease 2
YY1	Yin and Yang 1

Introduction

Afin d'assurer sa survie et son fonctionnement, un organisme doit réguler de façon précise dans l'espace et dans le temps l'expression de l'information génétique dont il dispose dans ses cellules, tout en maintenant son intégrité.

La compréhension de ces mécanismes fondamentaux est nécessaire pour la connaissance du fonctionnement du monde du vivant mais aussi pour expliquer l'origine de maladies comme le cancer ou les maladies génétiques et d'établir de nouvelles cibles afin de combattre ces maladies.

L'étude du facteur général de la transcription TFIIH est ainsi indispensable et légitimée par son rôle dans plusieurs des mécanismes fondamentaux de la cellule, comprenant notamment la transcription et la réparation de l'ADN.

Dans notre laboratoire, nous étudions particulièrement le rôle de ce complexe TFIIH dans la cellule. Pour se faire, nous adoptons différentes stratégies dont deux en particulier. La première est l'utilisation de drogues qui ont pour effet d'inhiber spécifiquement certaines activités enzymatiques de TFIIH, de plus en plus utilisée grâce à la découverte de nouvelles molécules agissant sur le complexe. La deuxième est la caractérisation des conséquences d'une mutation particulière dans TFIIH retrouvées chez des patients afin d'en déduire le rôle réel de TFIIH dans des conditions physiologiques.

Grâce à ces stratégies, les travaux réalisés au cours de ma thèse ont mené à la redéfinition de l'action de TFIIH dans l'initiation de la transcription, notamment au niveau de l'ouverture du promoteur du gène et du remodelage de la chromatine.

L'introduction de ce manuscrit sera donc majoritairement axée sur la transcription des gènes de classe II et le complexe TFIIH et dans une moindre mesure sur le mécanisme de réparation de l'ADN par excision de nucléotide afin de présenter les différentes maladies associées à des mutations dans TFIIH.

1. Transcription des gènes de classe II

La transcription est un processus moléculaire par lequel une copie appelée ARN, complémentaire d'une séquence d'ADN appelée matricielle, est effectuée dans le noyau d'une cellule. La transcription de l'ADN est réalisée par l'ARN polymérase (Pol) qui est un complexe enzymatique contenant plusieurs sous-unités. Quatre différentes ARN polymérases nucléaires (Pol I, Pol II, Pol III et Pol IV) ont été identifiées chez les eucaryotes

supérieurs, alors qu'une seule a été retrouvée chez les procaryotes et archées (Roeder and Rutter, 1969). Pol I est responsable de la synthèse des ARN ribosomiaux (ARNr), excepté l'ARNr 5S. Pol III est impliquée dans la transcription de petits ARN incluant l'ARNr 5S et les ARN de transfert ou ARNt. Pol IV a été identifiée seulement chez la plante et joue un rôle dans la protection du génome contre les virus et éléments transposables grâce à la synthèse de petits ARN interférents, à la méthylation de l'ADN dirigée par l'ARN et la formation d'hétérochromatine (Herr et al 2005 ; Kanno et al 2005 ; Onodera et al 2005). Enfin, l'ARN polymérase II transcrit les gènes de classe II et est responsable de la synthèse des ARN messenger (ARNm) codant pour les protéines, de la majorité des petits ARNs nucléaires et des micro-ARNs (Kornberg 1999 ; Sims et al 2004).

La transcription des gènes de classe II est un processus complexe et finement régulé. Dans cette partie, le mécanisme de transcription sera détaillé ainsi que les différents moyens mis en place afin de réguler ce processus.

1.1. Le Promoteur

Le promoteur est la région d'un gène où s'assemble la machinerie transcriptionnelle lors de l'initiation de la transcription. Cette région contient notamment le site d'initiation de la transcription (TSS) qui est le point de départ de la transcription et s'étend en amont et/ou en aval de la position +1. Brièvement, il existe deux principaux types de promoteurs : dispersés et concentrés (Smale and Kadonaga 2003 ; Carninci et al 2006).

Les promoteurs dispersés sont caractérisés par la présence de plusieurs TSS faibles dispersés sur une région de 50 à 100 pb. Ils ont été moins étudiés que les promoteurs concentrés, pourtant ils représentent au moins deux tiers des promoteurs humains, et ils sont retrouvés dans des régions riches en CpG, contrôlant des gènes constitutifs et de ménage.

Les promoteurs concentrés, quant à eux, ont un seul TSS positionné à un nucléotide spécifique ou éventuellement à quelques nucléotides adjacents. Ils sont présents sur un tiers des gènes humains et sont surtout présents sur des gènes développementaux et des gènes hautement régulés. Ces promoteurs ont la particularité de contenir des éléments du cœur du promoteur (*Core Promoter Elements* ou CPE) qui sont des séquences ADN où le complexe de pré-initiation (PIC) s'assemble. Ils sont organisés autour du TSS et localisés dans une région allant de 35 à 40 nucléotides en amont et/ou en aval de celui-ci. Le promoteur peut

contenir un nombre variable de ces éléments avec des combinaisons variées. L'élément le plus connu et le premier à avoir été identifié est la boîte TATA par P. Chambon et ses collègues, présente dans 10-20% des promoteurs des gènes humains. De nombreux autres éléments existent comme le BRE (*TFIIB Recognition Element*) (Lagrange 1998 ; Deng and Roberts 2005), l'Inr (*Initiator*) (Corden et al 1980), le DCE (*Downstream Core Element*) (Lewis et al 2000), le DPE (*Downstream Promoter Element*) (Burke and Kadonaga 1997) ou encore le MTE (*Motif Ten Element*) (Ohler et al 2002) (Figure 1 et Tableau 1).

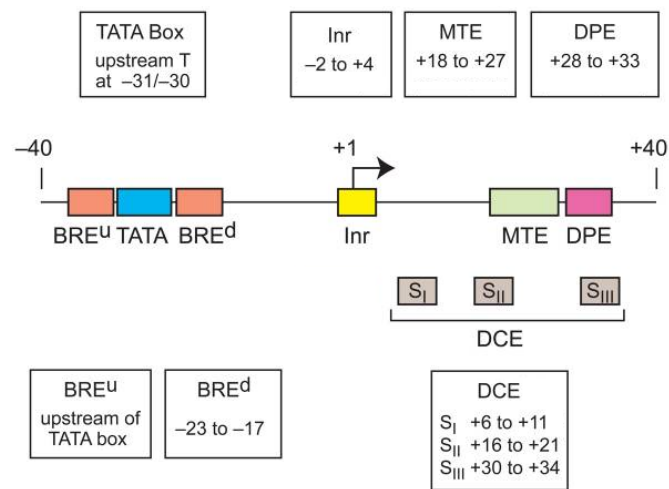


Figure 1 : Représentation schématique de plusieurs CPE sur un promoteur concentré d'un gène. Adaptée de Juven-Gershon and Kadonaga 2010

Éléments	Positions	Séquence consensus	Facteurs de liaison
BRE ^u	-38 à -32	SSRCGCC	TFIIB
TATA	-31/-30 à -24	TATAWAAR	TBP
BRE ^d	-23 à -17	RTDKKKK	TFIIB
Inr	-2 à +4	YYANWYY	TAF1/TAF2
MTE	+18 à +27	CSARCSSAACGS	TFIID
DPE	+28 à +33	RGWCGTG	TAF6/TAF9
DCE	S _I +6 à +11 S _{II} +16 à +21 S _{III} +30 à +34	CTTC CTGT AGC	TAF1

Tableau 1 : Caractéristiques des différents CPE. Adapté de Juven-Gershon and Kadonaga 2010

1.2. La machinerie transcriptionnelle

L'ARN polymérase II seule *in vitro* est capable de transcrire de l'ADN si on lui fournit une matrice simple brin. Par contre, sur une matrice d'ADN double brin comme c'est le cas dans la cellule, elle requiert l'action d'autres facteurs comme les facteurs généraux de transcription (TFII) et la formation d'un complexe de pré-Initiation (PIC) au niveau du promoteur du gène pour que la transcription commence au bon nucléotide et qu'elle soit bien coordonnée.

1.2.1. L'ARN polymérase II

L'ARN polymérase II (Pol II) a été pour la première fois isolée par Roeder et ses collègues (Roeder and Rutter 1969). Aussi appelée ARN polymérase B (Rpb), elle forme un large complexe de plus de 500 kDa composé de douze sous-unités nommées Rpb1 à Rpb12 (Tableau 2). Les 5 sous-unités Rpb5, 6, 8, 10 et 12 sont communes avec les ARN polymérases I et III. (Woychik and Young, 1990).

Sous-complexes	Sous-ensembles	Sous-unités	Caractéristiques	Size (kDa)
"Core"	Rpb1	Rpb1	Sites de phosphorylation	191,6
		Rpb5	Commune dans Pol I, II et III	25,1
		Rpb6	Commune dans Pol I, II et III	17,9
		Rpb8	Commune dans Pol I, II et III	16,5
	Rpb2	Rpb2	Site de liaison aux NTP	138,8
		Rpb9		14,3
	Rpb3	Rpb3	Reconnaissance du promoteur	35,3
		Rpb10	Commune dans Pol I, II et III	8,3
		Rpb11		13,6
		Rpb12	Commune dans Pol I, II et III	7,7
"Stalk"		Rpb4	Unique à Pol II	25,4
		Rpb7		19,1

Tableau 2 : Les différentes sous-unités de l'ARN polymérase II. Adapté de Wild and Cramer

L'ARN polymérase II est composée d'un sous-complexe « core » associé au sous-complexe « stalk » (Armache et al 2003) (Tableau 2). L'ensemble du complexe est d'abord assemblé dans le cytoplasme de la cellule avec l'aide de protéines de choc thermique (HSP) avant d'être exporté dans le noyau grâce à la machinerie d'import nucléaire (Boulon et al 2010).

L'équipe de Kornberg et ses collègues ont pu établir la structure de l'ARN polymérase II à une résolution de 2,8 Å permettant l'identification de plusieurs domaines (Cramer P et al 2001). Ces domaines peuvent être formés par différentes sous-unités de Pol II. Les deux sous-unités les plus volumineuses, Rpb1 et Rpb2, forment un sillon (*cleft*) bordé aux extrémités par une mâchoire supérieure (*upper jaw*), constituée par une partie de Rpb1 et de Rpb9, et une mâchoire inférieure (*lower jaw*) formée par Rpb5. Au fond de ce sillon sont localisés deux ions Mg^{2+} formant le site actif de l'enzyme où l'ADN, chargé négativement, peut se lier. Proche du site actif, l'hélice de pontage (*bridge helix*) fait partie de Rpb1 et traverse le sillon jusqu'à Rpb2 et serait responsable de la translocation de Pol II le long de l'ADN pendant l'élongation. La structure de Pol II a aussi montré la présence d'un pore allant du fond du sillon jusqu'à l'arrière de l'enzyme, servant à l'entrée des NTPs dans le site actif.

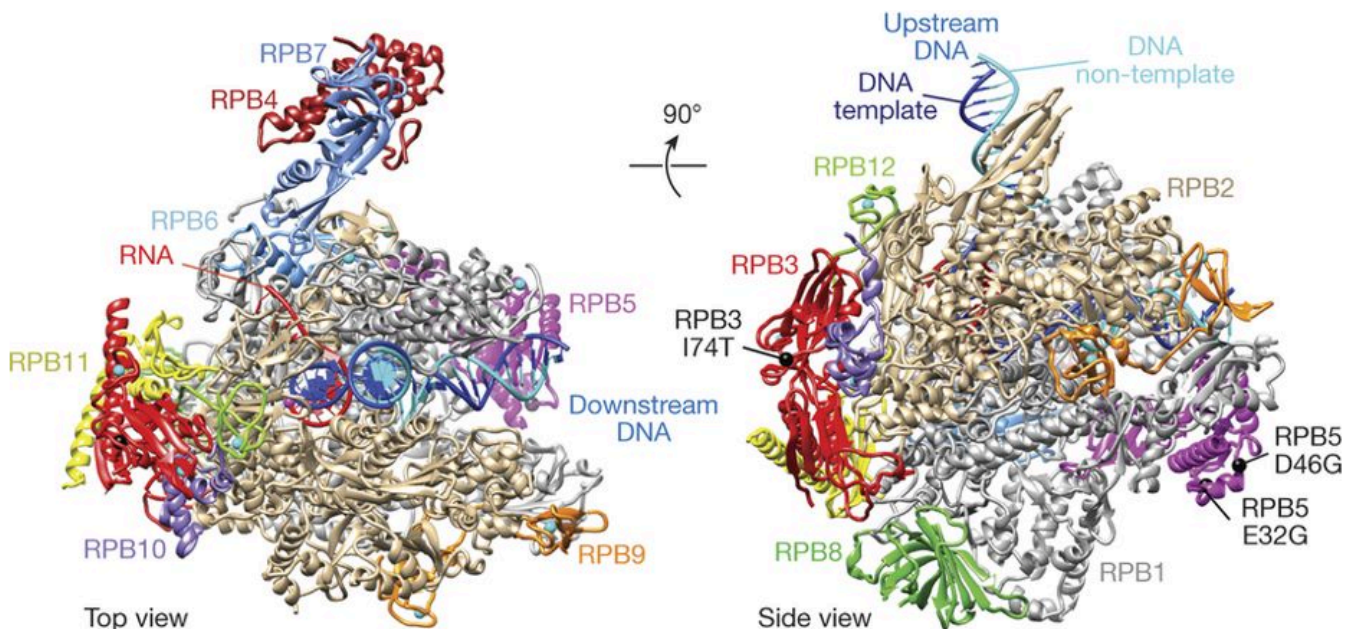


Figure 2 : Structures cristallographiques par cryo-EM de l'ARN polymérase II. Tirée de Bernecky et al 2016

Enfin des parties de Rpb1 et Rpb2 forment une pince (*clamp*) correspondant à une structure mobile. En effet, cette pince est capable d'effectuer une rotation de 30°, fermant ainsi le sillon autour du complexe ADN/ARN et formant un tunnel pour une élongation efficace (Gnat et al 2001 ; Bernecky et al 2016).

La sous-unité Rpb1 contient aussi le Domaine Carboxy-Terminal (CTD), un domaine important et représentant une caractéristique unique pour Pol II (Corden et al 1985). En effet, le CTD n'est pas nécessaire pour l'activité catalytique de Pol II *in vitro* mais permet un contrôle spécifique de sa fonction *in vivo* (Serizawa et al 1993). Chez l'humain, il est composé de 52 répétitions d'un hepta-peptide ayant pour séquence YSPTSPS. La régulation de Pol II se fait grâce aux modifications que subit le CTD pendant la transcription, permettant le recrutement de facteurs nécessaires aux différentes phases du cycle. Parmi les sept acides-aminés du peptide, cinq sont une cible potentielle pour la phosphorylation ou la déphosphorylation par des kinases ou des phosphatases respectivement (Egloff et al 2012). Ce sont les résidus tyrosine, thréonine et sérine Tyr1-Ser2-Th4-Ser5-Ser7, numérotés en fonction de leur position dans l'hepta-peptide. La chronologie des différents états de phosphorylation du CTD sera abordée dans la partie 1.3. Au départ, le complexe de pré-initiation, incluant les facteurs généraux de la transcription s'associe préférentiellement avec une Pol II déphosphorylée (Lu et al 1991 ; Robinson et al 2012). Puis le CTD devient le chef d'orchestre des différentes étapes de la transcription en fonction de son état de phosphorylation (Genes Robles and Coin 2019).

1.2.2. Les facteurs généraux de transcription

Comme mentionné précédemment, les facteurs généraux de transcription (TFII) sont requis pour l'action de Pol II dans la cellule, permettant par exemple son recrutement ou encore sa régulation (Tableau 3).

1.2.2.1. Le facteur général de la transcription IIA

TFIIA est un complexe de 3 sous-unités chez l'Homme : TFIIA α , TFIIA β et TFIIA γ . Il stimule la transcription en stabilisant la liaison de la sous-unité TBP (*TATA Binding Protein*) de TFIID sur la boîte TATA et est essentiel pour la formation du complexe de pré-initiation (Buratowski et al 1989). La déplétion de TFIIA provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G2, amenant à une forte diminution de la transcription des gènes (Kang and Dahmus 1995). De plus, il a été montré qu'il interagit avec l'élément BRE du promoteur pour stabiliser TFIID (Lee et al 1992). TFIIA communique aussi avec de nombreux facteurs comme TFIID, mais aussi des composants de SAGA et des coactivateurs.

1.2.2.2. Le facteur général de la transcription IIB

TFIIB est un polypeptide seul qui stabilise le complexe TFIID-ADN-TFIIA et aide, avec TFIIF, au recrutement de l'ARN polymérase II (Ha et al 1993 ; Maldonado et al 1990). Il participe aussi à la détermination de la position du TSS (Li et al 1994) et reconnaît l'élément BRE. Il se régule lui-même par auto-acétylation, ce qui stabilise l'interaction TFIIB-TFIIF (Choi et al 2003) et participe aussi à l'échappement du promoteur (Westover et al 2004).

1.2.2.3. Le facteur général de la transcription IID

Le complexe TFIID est le plus grand complexe parmi les facteurs généraux de la transcription. Il est composé de la protéine liant TATA (TBP) et de 14 autres protéines appelées facteurs associés au TBP ou TAFs. Le complexe est bien conservé entre les différentes espèces allant de l'Homme à la levure. La TBP et certains TAFs sont capables de lier différents CPE afin d'initier la formation du PIC, classant TFIID comme un facteur liant le promoteur. Comme son nom l'indique, la fonction de la sous-unité TBP est de se lier à la séquence consensus de la boîte TATA permettant à TFIID de reconnaître les promoteurs contenant une boîte TATA (Corden et al 1980). De plus l'interaction entre les TAFs et différents CPE permettent aussi à TFIID de reconnaître d'autres promoteurs ne contenant pas de boîte TATA (Burley and Roeder 1996). En effet, le dimère TAF1/TAF2 peut se lier à l'élément Inr (Chalkley and Verrijzer 1999) et TAF1 est aussi capable de se lier au DCE (Lee et

al 2005). TAF6/TAF9 peut se lier à la fois aux DPE (Burke and Kadonaga 1996) et MTE (Shao et al 2005).

Certaines sous-unités sont aussi capables d'interagir avec des récepteurs nucléaires (Lavigne et al 1999) afin de réguler la transcription.

Enfin TFIID interagit avec le facteur général de la transcription TFIIF (Dikstein et al 1996).

1.2.2.4. Le facteur général de la transcription IIE

TFIIE est un hétéro-dimère composé des 2 sous-unités TFIIE α et TFIIE β (Ohkuma et al 1991). Il joue un rôle essentiel dans l'initiation de la transcription en interagissant directement avec Pol II, le promoteur, TFIID, TFIIF et TFIIB (Maxon et al 1994 ; Okuda et al 2004 ; Tanaka et al 2009). TFIIE est impliqué dans la transition de l'initiation vers l'élongation grâce au domaine C-terminal de TFIIE β (Watanabe et al 2003). De plus, il a un rôle essentiel dans l'initiation de la transcription car des mutations dans TFIIE β perturbent les étapes précoces de la transcription (Compe et al 2019). En effet, TFIIE β se lie à Pol II puis recrute TFIIE α qui aide au recrutement de TFIIH en interagissant via la région C-terminale de TFIIE α avec la sous-unité p62 de TFIIH (Compe et al 2019). Il est aussi particulièrement impliqué dans le contrôle des activités enzymatiques de TFIIH, facilitant la formation d'un complexe de pré-initiation compétent (Ohkuma and Roeder 1994).

1.2.2.5. Le facteur général de la transcription IIH

TFIIH sera présenté en détail dans le chapitre 2.

1.2.2.6. Le facteur général de la transcription IIF

TFIIF a été identifié à travers sa forte interaction physique avec Pol II (Burton et al 1988). Cet hétéro-dimère est constitué de deux sous-unités : RAP30 et RAP74. Il est responsable, notamment grâce à RAP30, de l'incorporation de Pol II dans le complexe de pré-initiation et de sa liaison stable sur le promoteur (Flores et al 1991 ; Killeen et al 1992). TFIIF est essentiel dans l'échappement du promoteur et reste lié à Pol II durant l'élongation, où il améliore sa processivité et la vitesse de polymérisation (Yan et al 1999 ; Zhang and Burton 2004). Il est

aussi impliqué dans le processus de réinitiation de Pol II puisqu'il permet le recrutement de la phosphatase FCP1 qui est requise pour la déphosphorylation du CTD de Pol II, nécessaire pour un nouveau cycle de transcription (Archambault et al 1998).

Facteurs généraux de la transcription	Composition	Fonctions
TFIIA	TFIIA α , TFIIA β et TFIIA γ	Stabilise TFIID
TFIIB	TFIIB	Stabilise TFIID-ADN-TFIIA
TFIID	TBP et TAF1-14	Lie le promoteur, initie la formation du PIC, HPTM
TFIIE	TFIIE α et TFIIE β	Contrôle l'activité enzymatique de TFIIH, élongation
TFIIF	RAP74 et RAP30	Recrutement de Pol II, échappement du promoteur et élongation
TFIIH	XPB, XPD, p34, p44, p52, p62, p8, MAT1, Cycline H et CDK7 (XPG)	Ouverture du promoteur, phosphorylation du CTD de Pol II

Tableau 3 : Composition et fonctions des différents facteurs généraux de la transcription

1.2.3. Le médiateur

Le médiateur est un grand complexe composé de 25-30 protéines réparties en modules structuraux. Il forme un pont moléculaire entre Pol II et les facteurs de transcription se liant à l'ADN. Le médiateur a été découvert et purifié pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae* et est organisé en quatre sous-complexes (Poss et al 2013). Il montre aussi une conservation au cours de l'évolution allant de la levure jusqu'à l'Homme (Malik and Roeder 2000), mais sa composition dans différentes espèces peut varier en fonction de l'organisme et de l'état du cycle cellulaire. Le médiateur n'est pas seulement lié à Pol II, mais aussi au domaine de transactivation d'un nombre important de facteurs de transcription et de plusieurs facteurs généraux de la transcription. A travers ces interactions, il est capable de promouvoir l'initiation de la transcription par Pol II et de faciliter l'assemblage d'un PIC fonctionnel. L'étude du module contenant la kinase Cdk8 du médiateur a montré qu'il régulait la transcription en ciblant les sous-unités CDK7/cycline H de TFIIH, modulant ainsi la transition initiation/élongation en stimulant l'activité kinase de TFIIH (Kim et al 1994). De plus, l'association du médiateur avec Pol II est fortement inhibée *in vitro* par la phosphorylation du CTD via la sous-unité de TFIIH Kin28 (CDK7), suggérant que

le médiateur est un composant du complexe de pré-initiation avec un rôle dans l'échappement du promoteur (Guidi et al 2004).

Des analyses de ChiP sur le génome entier ont montré que le médiateur pouvait se lier aux régions *enhancer* et promotrices, où il colocalise avec Pol II (Andrau et al 2006). En effet il est impliqué dans la formation de boucles de chromatine résultant de l'interaction médiateur-cohésine, fournissant l'architecture chromosomale requise pour la transcription des gènes (Kagey et al 2010 ; Poss et al 2013).

1.3. Cycle de la transcription

Plusieurs étapes ont lieu pendant la transcription. Elle commence tout d'abord par l'initiation où la Pol II et les facteurs généraux de la transcription se lient au promoteur en formant le complexe de pré-initiation (PIC). Ensuite, Pol II entre dans la phase d'élongation le long du corps du gène. Finalement la terminaison a lieu et l'ARNm nouvellement synthétisé est libéré. Récemment, une nouvelle étape a été mise en évidence où la Pol II est en pause après l'initiation de la transcription et avant la phase d'élongation.

1.3.1. Assemblage du PIC et initiation

La première étape de la transcription par l'ARN polymérase II est l'assemblage du complexe de pré-initiation autour du TSS (He et al 2013 ; Sainsbury et al 2015). Dans le modèle classique, cela commence par la liaison de TFIID, via TBP, sur la séquence consensus de la boîte TATA si elle est présente. Si ce n'est pas le cas, les TAFs de TFIID peuvent aussi reconnaître d'autres éléments du promoteur. TBP a une forme de selle à cheval (Nikolov DB 1992) et sa surface concave lie la boîte TATA, provoquant une courbure d'environ 90° de l'ADN (Figure 3). Cette interaction est ensuite stabilisée par l'arrivée de TFIIA grâce à sa liaison sur la région en amont de la boîte TATA et sur TBP (Stargell et al 2001). De plus, TFIIB est recruté pour faciliter la liaison de TBP à l'ADN et faciliter la courbure de l'ADN (Zhao and Herr 2002). L'ARN polymérase II est alors recrutée sur le promoteur, accompagnée de TFIIIF. TFIIIF empêche les interactions non spécifiques de Pol II avec l'ADN (Conaway et al 1991) et stabilise le PIC (Tan et al 1994). Enfin TFIIIE et TFIIH sont les derniers à rejoindre le complexe pour former un PIC complet qui contient un promoteur fermé et double brin (Figure 3).

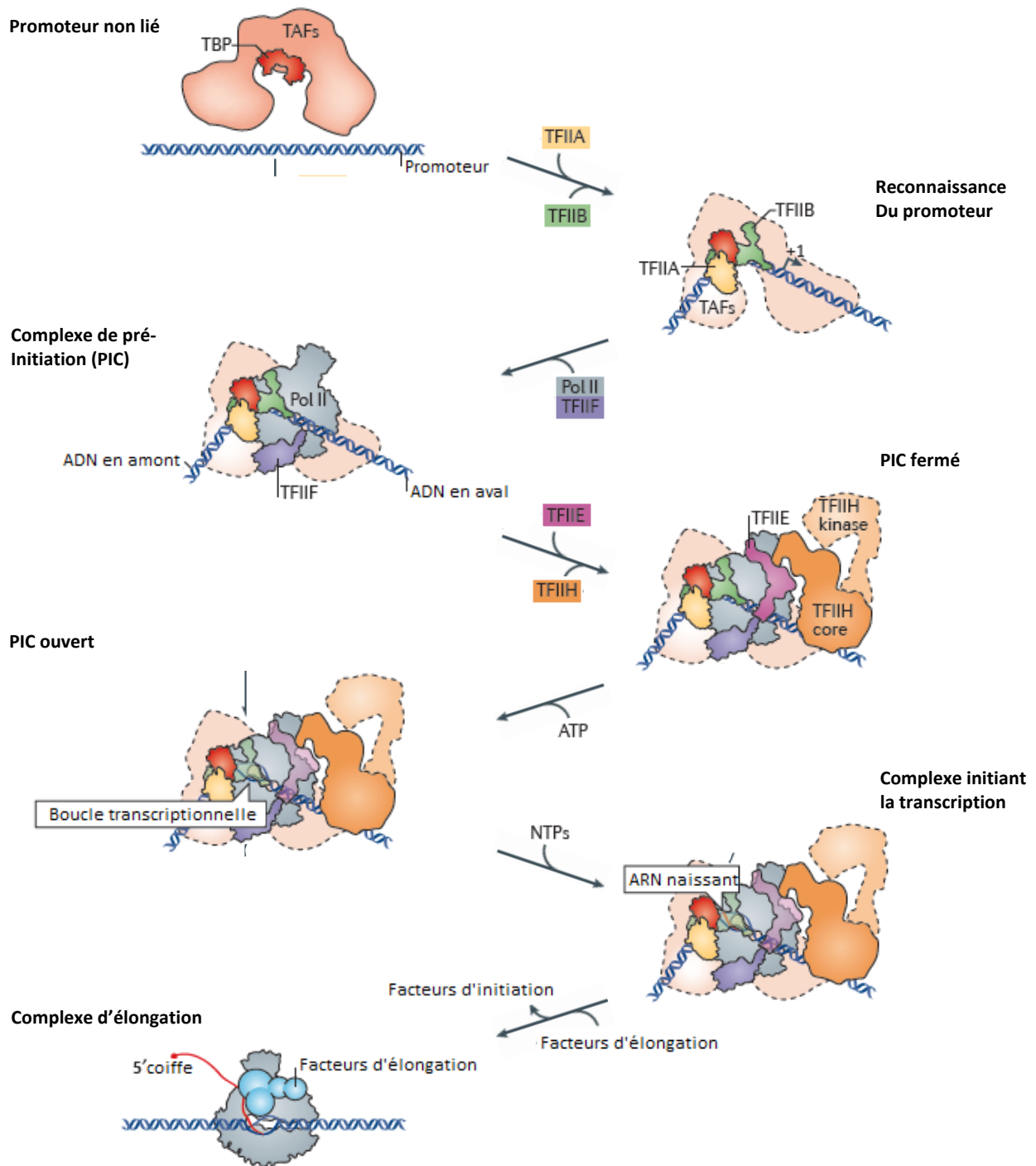


Figure 3 : Représentation schématique de l'initiation de la transcription. Adaptée de Sainsbury et al 2015

TFIIE β se lie au PIC et permet l'ancrage de TFIIE α , qui induit l'incorporation de TFIIH entier dans le PIC (Compe et al 2019). TFIIE sert de structure adhésive pour l'assemblage de TFIIH

avec le reste de la machinerie de l'initiation de la transcription, sans qui le recrutement de TFIIH ne serait pas possible (Yan et al 2019).

TFIIH est alors essentiel afin d'initier la transcription. Son rôle dans la transcription sera abordé plus en détail dans la partie 2.3. Brièvement, il joue un rôle dans l'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur, permettant la transition d'une conformation fermée du PIC à une conformation ouverte. L'ouverture du promoteur crée une boucle de 11-15 pb et le brin non-codant est inséré dans le site actif de Pol II (Figure 3). La synthèse du premier nucléotide fait évoluer le complexe à conformation ouverte en un complexe initiant la transcription (Hantsche and Cramer 2017). Ce complexe entre dans plusieurs initiations abortives qui produisent seulement de courts oligonucléotides de moins de 10 pb. Si un ARN nouvellement synthétisé atteint 10 pb, alors la Ser5 du CTD est phosphorylée par TFIIH et Pol II se dissocie du complexe d'initiation afin de commencer l'élongation. Cette étape est appelée l'échappement du promoteur. Ensuite l'ARN atteint une longueur de 25 pb, la machinerie de la coiffe est recrutée et cette étape permet à une transcription productive de démarrer.

1.3.2. Pause proximale / Elongation

Avant d'entrer dans la phase d'élongation, DSIF (*DRB Sensitivity Inducing Factor*) et NELF (*Negative Elongation Factor*) se lient à Pol II et inhibent ses fonctions, forçant Pol II à effectuer une pause 20 à 100 nucléotides après le TSS (Wu et al 2003). Cet effet inhibiteur est supprimé grâce à la phosphorylation de Spt5, la plus grosse sous-unité de DSIF, et de NELF par la kinase Cdk9 faisant partie du complexe p-TEFb (*positive Transcription Elongation Factor b*) (Yamada et al 2006 ; Bernecky et al 2017).

Puis l'élongation prend place au moment où la Ser-5 du CTD est déphosphorylée par Rtr1 qui s'accompagne de l'augmentation simultanée de la phosphorylation de la Ser2 par Cdk9. Pendant l'élongation, Pol II est accompagnée par les facteurs d'élongation TFIIIS, la phosphatase ELL, l'élongine et p-TEFb. Ces facteurs maintiennent l'hybride ADN/ARN, ce qui est nécessaire à la processivité de Pol II durant l'élongation (Wind and Reines 2000).

1.3.3. Terminaison / Réinitiation

La terminaison est la dernière étape de la transcription et a lieu quand le complexe d'élongation atteint l'extrémité 3' du gène. Il y a deux voies pour finir la transcription, qui dépendent de la séquence du gène (Kuehner et al 2011).

La première implique CPSF (*Cleavage and Polyadnylation Specificity Factor*), qui interagit avec Pol II et reconnaît le signal poly A spécifique de la fin 3' du gène. Cela provoque l'arrêt de l'élongation. Puis CstF (*Cleavage Stimulatory Factor*) induit le clivage de l'ARN. Pol II est ensuite libérée et l'ARN nouvellement synthétisé est polyadénylé. La partie restante de l'ARN, en aval du site de clivage, est alors dégradée par XRN2. La plupart des gènes humains suivent cette voie.

Pour les autres gènes, la terminaison est achevée à travers la dissociation du complexe ARN/ADN par la protéine Senataxine 1 (Sen1). Dans ce cas, l'ARN résultant n'est pas polyadénylé, comme c'est le cas pour les longs ARNs non-codants.

Plusieurs études ont montré que les machineries transcriptionnelles au niveau du promoteur et du terminateur sont entremêlées (Hampsey et al 2011). La libération de Pol II requiert la déphosphorylation de son CTD qui lui permet de revenir à son état d'hypophosphorylation. Cette Pol II libérée est capable d'effectuer un nouveau cycle de transcription. Cependant, certains facteurs généraux de la transcription restent parfois associés au promoteur et peuvent induire la réinitiation de Pol II. De plus, l'interaction entre promoteur et terminateur grâce à une boucle du gène (*gene looping*) est impliquée dans la réinitiation (El Kaderi et al 2009). TFIIB dirige l'assemblage d'une telle réinitiation sur le promoteur en interagissant avec les complexes CPSF et Cstf et cette interaction est régulée par la phosphorylation de TFIIB (Figure 4) (Wang et al 2010).

En plus de TFIIB, TFIIF et PC4 (*Positive Cofactor 4*) sont également impliqués dans la réinitiation via la boucle du gène à travers leur interaction avec l'extrémité 3' du gène (Shandilya and Roberts 2012).

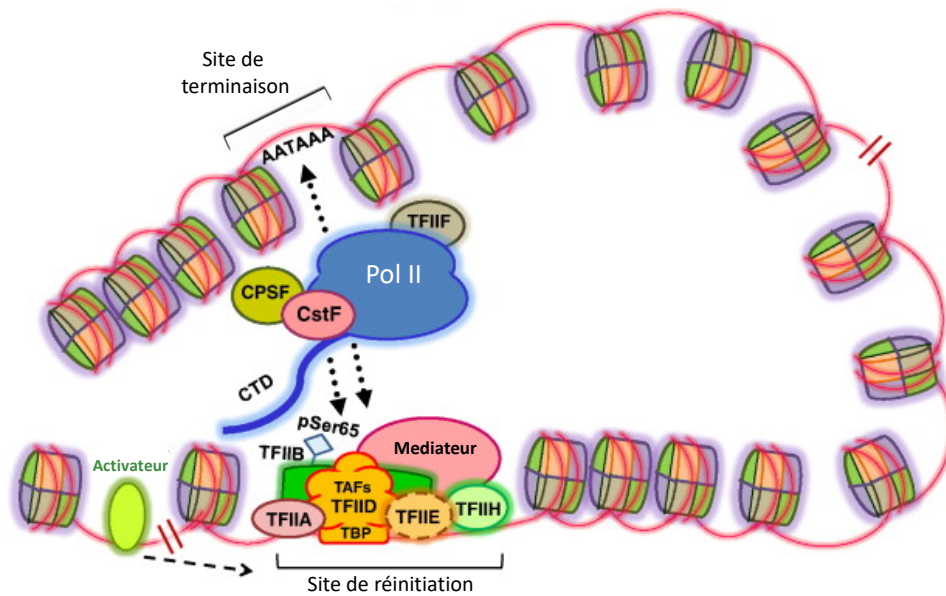


Figure 4 : Recyclage de Pol II grâce à la formation d'une boucle du gène. Adaptée de Shandilya and Roberts 2012

1.3.4. Phosphorylation du CTD

Comme montré précédemment, la phosphorylation du CTD de Pol II coordonne les différentes étapes de la transcription. Les phosphorylations les plus étudiées sont celles de la Ser-5 et de la Ser-2, qui sont respectivement associées à l'initiation de la transcription au niveau du promoteur et l'engagement de Pol II en élongation (Buratowski 2009). Les résidus Ser-5 et Ser-7 sont phosphorylés par CDK7 (*Cyclin-Dependent Kinase 7*), qui fait partie du complexe TFIIH, permettant l'initiation de la transcription et l'échappement du promoteur de Pol II (Wong et 2014 ; Zhou et al 2000). Ser-5 phosphorylée est aussi impliquée dans le recrutement de la machinerie permettant la mise en place de la coiffe de l'extrémité 5' de l'ARN (Schroeder et al 2000). Ces marques sont rapidement supprimées après l'initiation de la transcription. La phosphorylation de Ser-2 par CDK9 permet la fin de la pause transcriptionnelle (Jonkers and Lis, 2015) et reste tout au long de l'élongation. De plus Ser-2 phosphorylée est nécessaire pour que les machineries d'épissage et de clivage de l'ARN soient co-recrutées (Gu et al 2013). Ces modifications spécifiques de Ser-2 et Ser-5 créent des sites de liaison pour le recrutement d'autres kinases (Buratowski 2009). Par exemple CDK9 se lie directement au résidu Ser-5 phosphorylé par CDK7 pour phosphoryler Ser-2 et

engager Pol II en élongation. Cela permet de fournir un mécanisme bien orchestré pour l'action séquentielle des kinases du CTD dans l'expression des gènes de classe II (Figure 5). Concernant les autres résidus, la phosphorylation de Tyr-1 et Thr-4 permettent l'arrivée de la machinerie de poly-adénylation (Harlen et al 2016 ; Hsin et al 2011). Le résidu Thr-4 phosphorylé servirait aussi pour le recrutement de facteurs ayant un rôle dans la terminaison de la transcription. Par exemple, chez la levure, le facteur de terminaison Rtt103 est recruté en se liant à pThr-4 et pSer-2 afin de faciliter la terminaison de la transcription des gènes codant pour des snoARN (*small nucleolar RNA*) (Nemec et al 2017). La kinase Hrr25 a été identifiée comme responsable de la phosphorylation de Thr-4. En effet durant l'élongation, Hrr25 est recruté par pSer-2 (et/ou pSer-5) et phosphoryle Thr-4 afin de recruter Rtt103 pour finir la transcription (Nemec et al 2018) (Figure 5). Bien que le CTD parait simple dans l'organisation de sa séquence primaire, il est clair que les modifications variées du CTD ne sont pas totalement comprises.

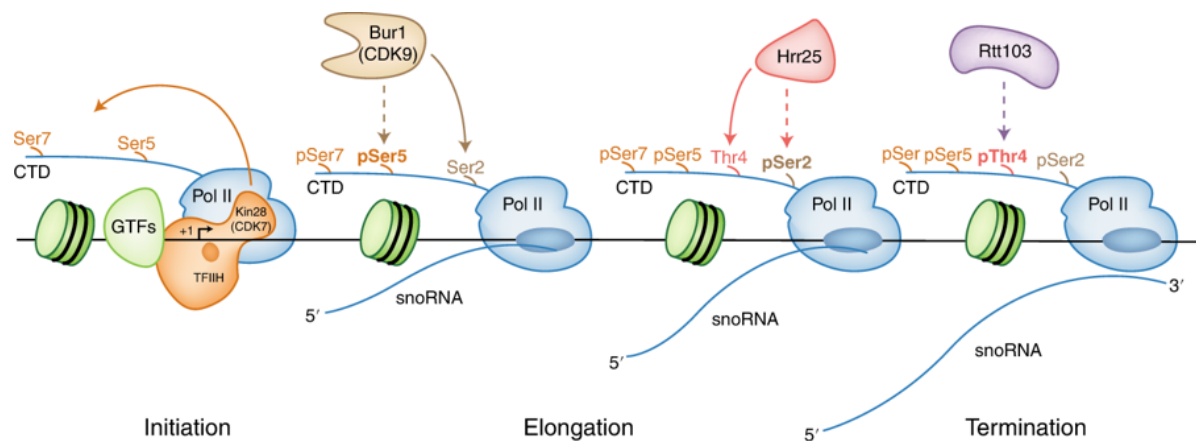


Figure 5 : Phosphorylation du CTD de Pol II durant l'initiation de la transcription, l'élongation et la terminaison d'un snoARN chez la levure. Tirée de Genes Robles and Coin 2019

1.4. Régulation de la transcription

La transcription est un processus complexe et finement régulé. L'un des mécanismes de régulation est porté par le fait que l'ADN est rarement nu et libre d'accès à l'intérieur du

noyau. En effet, il peut être modifié chimiquement afin d'altérer son accessibilité et il est incorporé à l'intérieur de la chromatine où il est physiquement compacté.

1.4.1. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est retrouvée dans la plupart des organismes vivants, de la bactérie aux mammifères (Bird 2002). Elle correspond à l'ajout d'un groupe méthyl à la position 5 d'une cytosine (5mC) faisant partie d'un dinucléotide CpG. Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN a un rôle dans la régulation de la transcription, impliquée ainsi dans l'inactivation du chromosome X, l'empreinte génomique ou encore la répression des éléments transposables. La carte génomique de la méthylation est établie *de novo* durant la vie embryonnaire par l'ADN méthyltransférase Dnmt3 et est plus tard maintenue par Dnmt1 durant la mitose.

La méthylation de l'ADN au niveau des régions du promoteur est associée à la répression transcriptionnelle. La présence de groupes méthyls à l'intérieur de l'ADN est supposée engendrer un obstacle qui perturbe les contacts ADN/Facteur de transcription et bloque l'activation du gène (Watt and Molloy 1988). A l'inverse, la liaison de facteurs de transcription à l'ADN peut aussi influencer son statut de méthylation et générer des régions faiblement méthylées ou LMR (*Low Methylated Regions*) (Stadler et al 2011). De plus la méthylation de l'ADN participe aussi à la répression des gènes en recrutant des protéines de la famille MBD (*Methyl CpG Binding Domain*), capables de réprimer la transcription (Bird and Wolffe 1999).

Afin de réguler positivement la transcription, la méthylation de l'ADN doit être altérée dans la cellule. La TET dioxygénase est responsable de l'oxydation de 5mC en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), puis en 5-formylcytosine (5fC) et enfin en 5-carboxycytosine (5caC). 5fC et 5caC peuvent alors être supprimées par une ADN glycosylase (TDG) pour être restaurées en une cytosine par le mécanisme de réparation par excision de base ou BER (Weber et al 2016) (Figure 6).

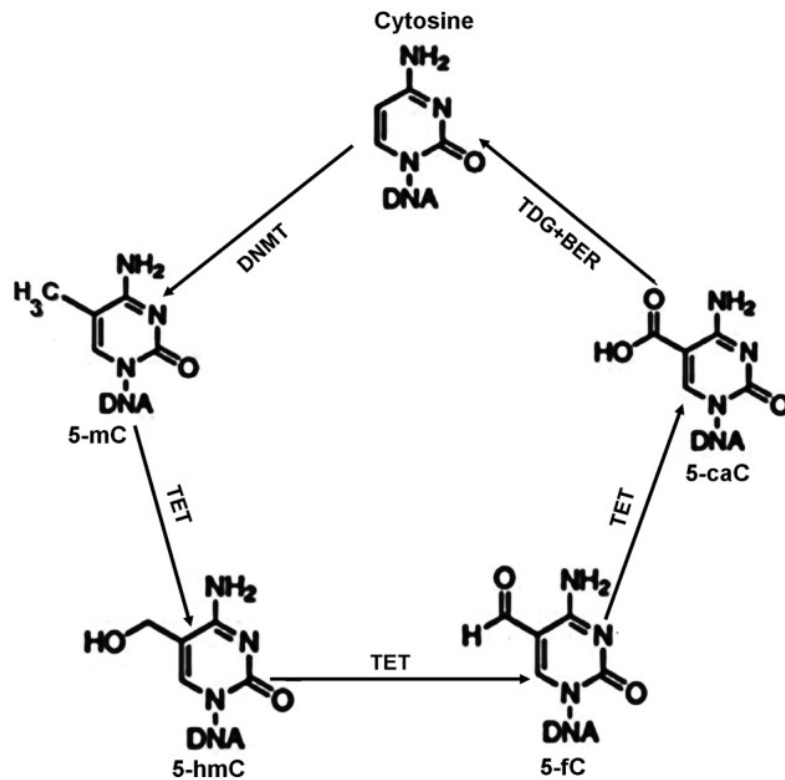


Figure 6 : Méthylation et déméthylation d'une cytosine. Tirée de Kang and Hyun 2017

1.4.2. Remodelage de la chromatine

1.4.2.1. Caractérisation de la chromatine

L'ADN est incorporé à l'intérieur d'un complexe nucléoprotéique appelé chromatine. Cette structure permet de protéger l'ADN de dommages physiques ou encore de réguler le mécanisme de transcription. Le génome subit différents niveaux de compaction grâce auxquels l'ADN mesurant 2 mètres de long est contenu dans le noyau de la cellule. Cette conformation en trois dimensions est un moyen de réguler l'accessibilité de l'ADN et ainsi la transcription.

Le premier niveau de compaction est formé par l'enroulement de 147 paires de bases d'ADN autour d'un octamère d'histones afin de former le nucléosome (Figure 7) (Luger et al 1997). L'octamère est constitué de deux copies de chacun des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4. Les histones sont de petites protéines (11 à 22 kDa) qui sont bien conservées au cours de l'évolution. Elles sont enrichies en acide-aminés chargés positivement comme la lysine ou

l'arginine afin d'interagir avec l'ADN chargé négativement. L'assemblage de l'octamère débute par la formation d'un dimère H3-H4. Puis deux dimères H3-H4 s'assemblent pour former un tétramère. Enfin deux dimères H2A-H2B sont ajoutés au tétramère pour former l'octamère complet (Arents and Moudrianakis 1995). Ainsi la chromatine correspond à une succession de nucléosomes et de séquences inter-nucléosomales, formant comme un collier de perles de 11 nm de diamètre.

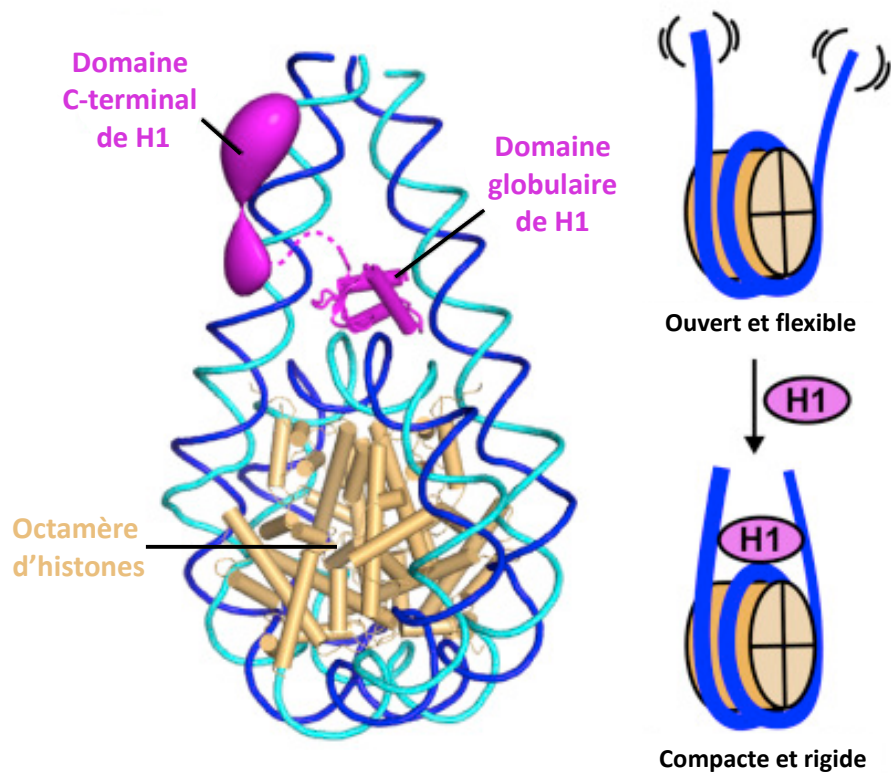


Figure 7 : Structures schématiques d'un nucléosome. Adaptée de Bednar et al 2017

L'ADN subit ensuite un deuxième niveau de compaction pour donner une structure plus stable et d'ordre supérieur, la fibre de 30 nm de diamètre (Woodcock and Dimitrov 2001). L'histone H1, aussi appelé histone *linker*, est essentielle pour la formation de cette structure (Robinson et al 2006 ; Bednar et al 2017). Elle est capable de se lier à l'ADN, à l'endroit d'entrée et de sortie dans le nucléosome et stabilise la structure chromatinienne d'ordre supérieur (Figures 7 et 8). Cependant, l'existence de cette fibre de 30nm de diamètre *in vivo* est remise en cause. Des études récentes utilisant la cryo-microscopie électronique n'ont pas été capables de détecter cette fibre de 30nm mais ont plutôt rapporté la présence d'une fibre désordonnée de 5-24nm de diamètre (Ou et al 2017 ; Maeshima et al 2019).

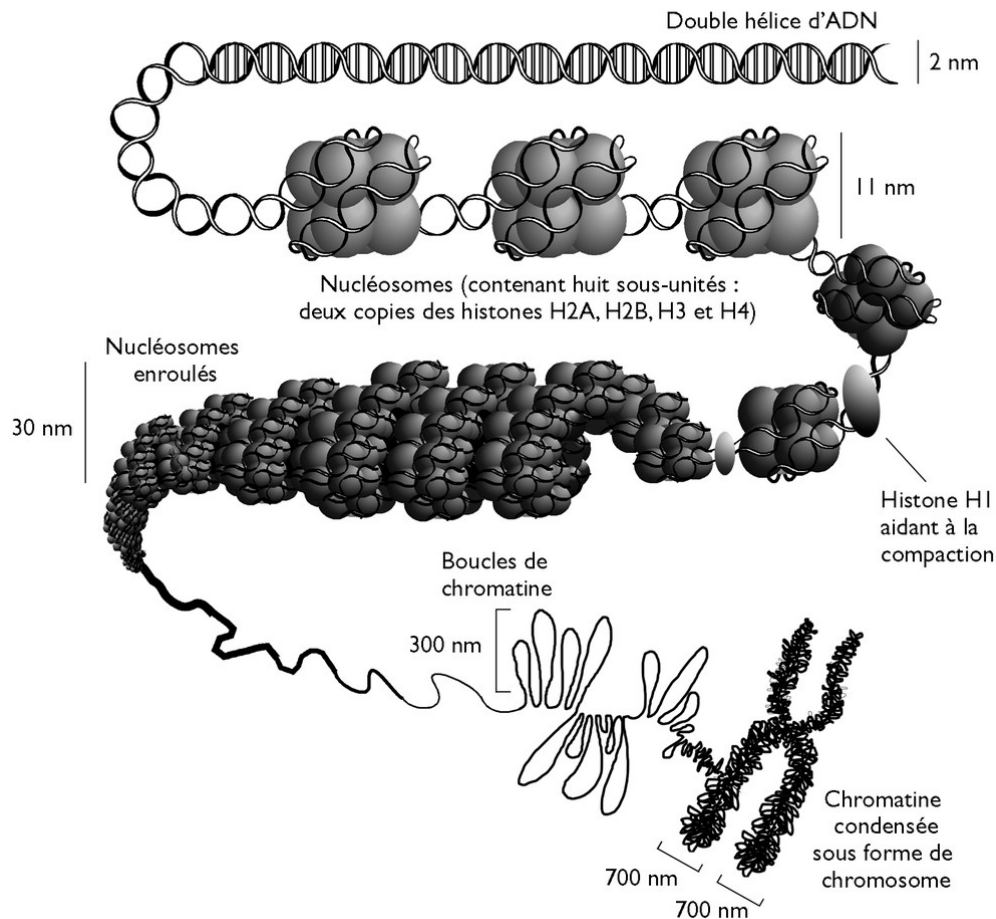


Figure 8 : Les différents états de compaction de la chromatine. Tirée de Legastelois et al

2017

Des états d'organisation plus condensés peuvent ensuite être mis en place avec une condensation maximale de la chromatine. Ces structures dites tertiaires vont de la formation d'une fibre d'environ 300 nm de diamètre, jusqu'à l'état le plus condensé qui est le chromosome métaphasique de 1400 nm de diamètre (Figure 8).

En fonction de l'état de compaction, la chromatine peut être catégorisée en euchromatine (chromatine décondensée, accessible aux facteurs de transcription) et en hétérochromatine (chromatine compacte, inaccessible).

Les processus transcriptionnels tels que la transcription, la réparation ou la réplication de l'ADN ont lieu avec la séparation des deux brins d'ADN et sont donc entravés par les nucléosomes et la compaction de la chromatine. Par conséquent, il devient essentiel à la cellule de remodeler ou de réarranger la chromatine afin de permettre la réalisation de ces processus.

1.4.2.2. Remodelage de la chromatine

Il existe différents mécanismes de remodelage de la chromatine tels que les modifications post-traductionnelles des histones (HPTM), l'incorporation de variants d'histones dans les nucléosomes ou encore l'action de remodeleurs ATP-dépendants. Cependant seules les HPTM seront présentées ici.

Les histones ont une extrémité N-terminale, appelée queue d'histone, qui se projette en dehors du nucléosome. Cette partie est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles grâce à l'action d'activités enzymatiques variées comme la phosphorylation, la méthylation, l'acétylation, l'ubiquitination, la citrullination (ou déimination) ou d'autres activités découvertes plus récemment (Figure 9) (Kouzarides 2007).

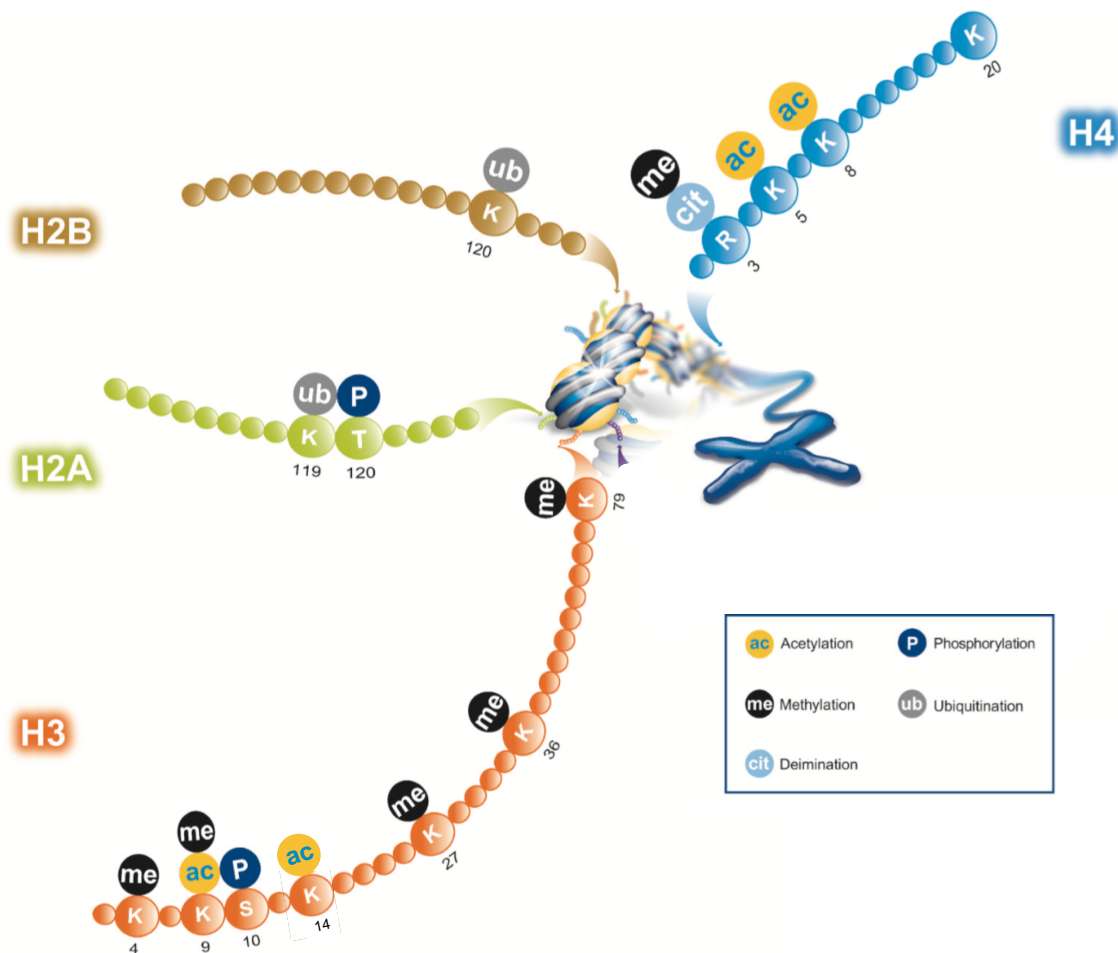


Figure 9 : Représentation non exhaustive de différentes marques post-traductionnelles des histones. Adaptée de <http://docs.abcam.com>

De plus, certaines modifications ont été retrouvées à l'intérieur de l'octamère d'histone (Yu et al 2012) ou sur la petite extrémité C-terminale de certaines histones. Les modifications sont généralement présentes à des moments spatiaux et/ou temporels spécifiques et associées avec soit une transcription active, soit une répression transcriptionnelle. En effet, l'euchromatine est typiquement enrichie en histones acétylés, par exemple l'acétylation de la lysine-9 de l'histone H3 (H3K9Ac) ou de la lysine-16 de l'histone H4 (H4K16Ac) et montre aussi la méthylation de certaines lysines comme la lysine-4 de l'histone H3 (H3K4me3) (Grunstein 1997 ; Bannister and Kouzarides 2011). Par contre, l'hétérochromatine est caractérisée par une hypoacétylation des histones et la méthylation d'histones spécifiques, par exemple la lysine-9 de l'histone H3 (H3K9Me) (Rea et al 2000 ; Jenuwein and Allis 2001). Les HPTM peuvent modifier les charges électriques des histones et ainsi impacter les contacts histone/histone ou histone/ADN. Elles peuvent aussi servir de plateforme de recrutement pour d'autres protéines qui pourront agir à leur tour sur la chromatine ou sur la transcription.

1.4.2.2.1. Acétylation des histones

L'acétylation est la première HPTM à avoir été décrite (Allfrey and Mirsky 1964). Elle est effectuée par une histone acétyl-transférase (HAT), principalement sur un résidu lysine (K) (Kouzarides 2007). Cette enzyme utilise un acétyl-CoA comme donneur pour catalyser la réaction (Figure 10).

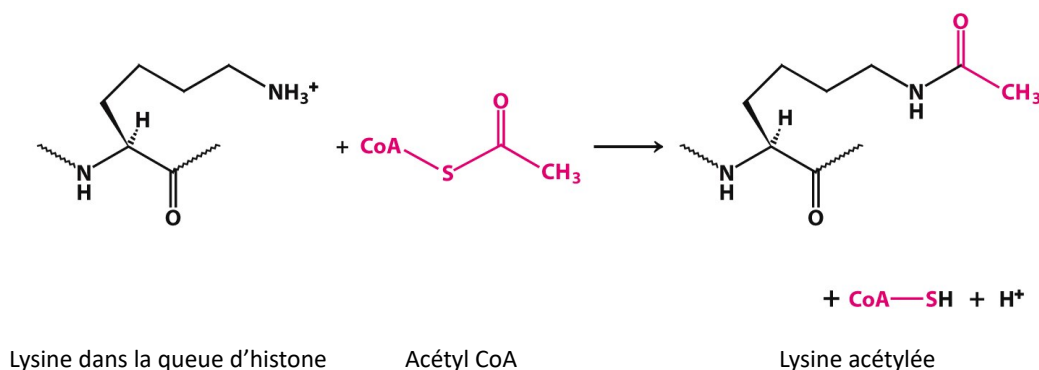


Figure 10 : Réaction d'acétylation d'une lysine. Adaptée de <http://oregonstate.edu>

L'acétylation supprime la charge positive de la lysine et diminue son interaction avec l'ADN chargé négativement. Cela mène à la décondensation de la chromatine et est généralement associé à une transcription active des gènes (Spotswood and Turner 2002). La réaction inverse est la déacétylation et est catalysée par une histone déacétylase (HDAC), afin de restaurer la charge positive de la lysine.

Les HAT sont divisées en deux catégories. Les HAT de type A sont localisées dans le noyau où elles acétylent les histones associées à la chromatine. Celles du type B sont localisées dans le cytoplasme et sont responsables de l'acétylation des histones nouvellement formées.

Les HAT de type A sont subdivisées en trois familles : i) la famille des GNAT (GCN5-related N-Acetyl Transferases) qui incluent la protéine KAT2A (*Lysine Acetyltransferase 2A*), aussi appelée GCN5 (*General Control of Nutrition protein 5*), et son homologue, la protéine KAT2B aussi appelée PCAF (*p300/CBP-Associated Factor*), ii) la famille des MYST (MOF - Ybf2/Sas3 - Sas2 - Tip60) et iii) les autres comme CBP (CREB-Binding Protein) et p300 (Kimura et al 2005).

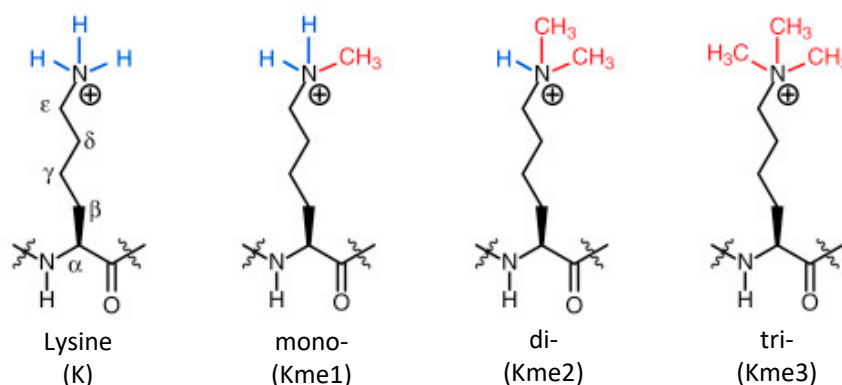
KAT2A est contenue dans deux différents complexes au niveau de leur module HAT : ATAC (*Ada Two A-Containing*) et SAGA (*Spt-Ada-Gcn5 Acetyltransferase*). Les deux complexes stimulent l'activité HAT de KAT2A, notamment ATAC (Riss et al 2015). Dans ces complexes, KAT2A acétyle principalement H3K9 et H3K14 mais sur des positions génomiques distinctes. ATAC associé à KAT2A cible des régions activatrices (*enhancer*) (Krebs et al 2011 ; Nagy et al 2010). Quand KAT2A est incorporée dans le complexe SAGA, elle peut aussi acétyler les résidus H3K18 et H3K23 (Rodriguez-Navarro 2009).

Les HDAC sont les enzymes responsables de la suppression du groupe acétyle des résidus lysine. Elles sont divisées en quatre classes en fonction de leurs différences structurales. Elles utilisent Zn²⁺ comme cofacteur excepté pour la classe des sirtuines (Sirt) qui utilisent le NAD⁺ (Thaler and Mercurio 2014). Les HDAC ont une faible spécificité et ont besoin d'être régulées. Par exemple, Sirt1 requiert TFIIH pour entrer en contact et déacétyler le cofacteur PGC-1 α (Traboulsi et al 2014).

1.4.2.2.2. Méthylation des histones

La méthylation des histones peut avoir des effets variés dépendant du résidu ciblé et de sa position. La méthylation cible à la fois les résidus lysine et arginine mais n'altère pas leur charge ou la structure de l'histone. Les résidus méthylés semblent plutôt servir de plateforme pour le recrutement de différentes protéines, capable d'altérer l'état de la chromatine ou le statut transcriptionnel. La lysine peut être mono-, di- ou triméthylée avec des conséquences variables, mais l'arginine peut seulement être mono- ou diméthylée (Figure 11) (Bedford and Clarke 2009 ; Greer and Shi 2012). La réaction enzymatique est réalisée par une histone méthyltransférase (HMT), qui transfère le groupe méthyle de la S-adenosyl methionine à un résidu cible. La réaction inverse est réalisée par une déméthylase.

Etats de méthylation de la lysine



Etats de méthylation de l'arginine

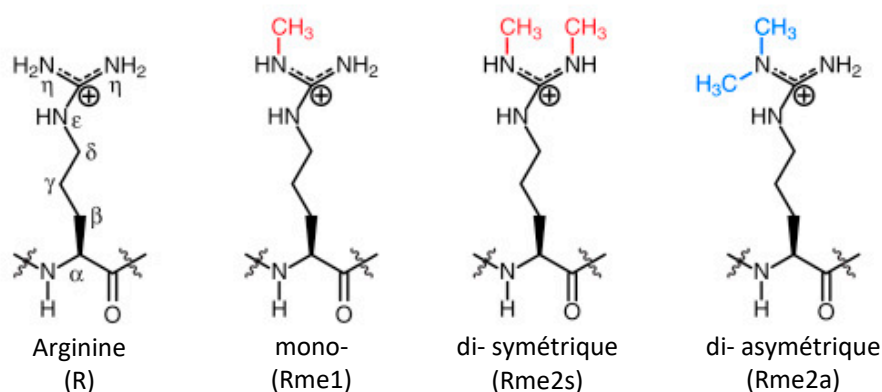


Figure 11 : Les différents états de méthylation de la lysine et de l'arginine. Adaptée de Botuyan and Mer 2016

Il existe trois familles de HMT. Les *SET-domain-containing proteins* et les *DOT1-like proteins* sont toutes deux capables de méthyler les résidus lysine. Par contre, les PRMT (*Protein arginine Methyl Transferases*) méthylent les résidus arginine. H3K4 est notamment triméthylé par le complexe SET1/COMPASS au niveau des promoteurs des gènes avec un niveau de transcription élevée (Schneider et al 2005).

1.4.2.2.3. Autres HPTM

En plus des acétylations et méthylations des histones, il existe d'autres modifications possibles, incluant la phosphorylation, l'ubiquitination, la glycolysation, l'ADP-ribosylation, la carbonylation, la SUMOylation ou encore la citrullination.

La phosphorylation des histones, qui a lieu sur des résidus sérine (H3S10) et thréonine, peut influencer la transcription, la condensation des chromosomes, la réparation de l'ADN ou encore l'apoptose. Le niveau de cette modification est contrôlé par des kinases et phosphatases qui respectivement ajoutent et suppriment le groupe phosphate de l'acide aminé cible.

L'ubiquitination est une autre modification des histones où une ubiquitine s'attache à une lysine par l'action séquentielle de trois enzymes : E1 est la protéine activant l'ubiquitine, E2 est la protéine conjuguant l'ubiquitine et E3 est la protéine liant l'ubiquitine. L'ubiquitination est hautement dynamique et le degré d'ubiquitination peut varier en fonction de la spécificité du substrat. Enfin, des études récentes ont montré un rôle crucial de l'ubiquitination des histones dans la régulation transcriptionnelle et la réparation de l'ADN. Les différentes histones H2A, H2B, H3, H4 et l'histone *linker* H1 peuvent être modifiées par ubiquitination. Par exemple, H3 et H4 sont polyubiquitinées *in vivo* par le complexe ubiquitine ligase CUL4-DDB-RBX1 après irradiation aux UV (Cao and Yan 2012).

La SUMOylation est une modification similaire à l'ubiquitination et cible les lysines des histones grâce à des enzymes E1, E2 et E3. Elle peut être détectée dans les quatre histones du cœur du nucléosome et fonctionnerait de façon opposée à l'acétylation et l'ubiquitination.

Les résidus glutamate et arginine des histones sont aussi sujets à la mono- ou polyADP-ribosylation. Elle est médiée par la famille des polyADP ribose polymérasés (PARP) et éliminés par la famille des polyADP ribose glycohydrolases (PARG).

Avec la connaissance de toutes ces HPTM, il est devenu évident que les facteurs associés à la chromatine contiennent de nombreux domaines variés de liaison aux histones, augmentant ainsi la spécificité pour la reconnaissance des histones.

1.4.2.3. Réarrangement de la chromatine

L'expression des gènes peut aussi être régulée à travers de longues distances. Le réarrangement correspond à de larges boucles de chromatine qui permettent de rapprocher un gène spécifique avec un élément distant de régulation, soit en amont soit en aval du gène, afin de réguler la transcription de ce gène (Kadauke and Blobel 2009).

1.4.2.3.1. *Enhancer/silencer*

Les gènes possèdent des éléments de régulation qui permettent le contrôle de leur niveau transcriptionnel. Il existe deux types d'élément de régulation, classifiés selon la distance les séparant du TSS : les séquences proximales et les séquences distales.

Les séquences proximales sont localisées entre 40 et 200 pb en amont du TSS. Elles sont reconnues par des protéines liant spécifiquement ces séquences pour activer ou inhiber la transcription (Figure 12).

Les séquences distales sont localisées à plusieurs milliers de paires de base en amont ou en aval du TSS. Elles sont nommées amplificateurs ou *enhancers* quand elles activent la transcription et inactivateurs ou *silencers* quand elles répriment la transcription. Ces éléments sont capables d'interagir avec le promoteur cible grâce à la formation de boucles de chromatine, régulant ainsi la transcription (Cook 2003 ; Saiz et al 2005) (Figure 12). Une proximité physique entre un *enhancer* et son promoteur cible stimule la formation du PIC et active la transcription (Deng and Blobel 2010).

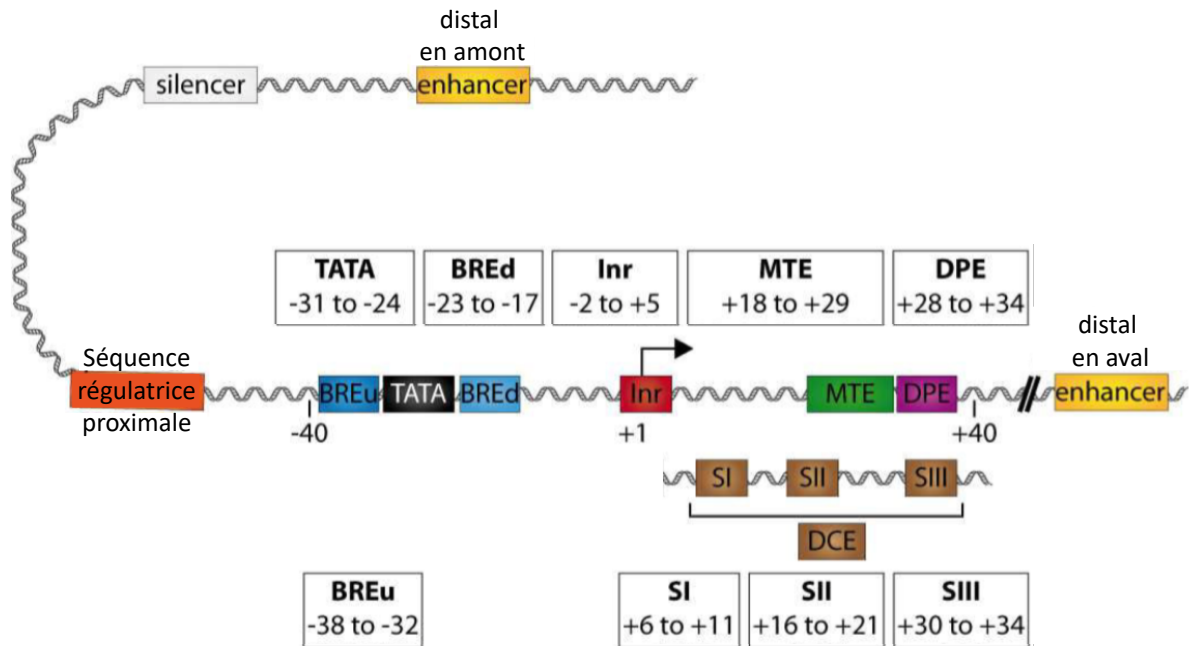


Figure 12 : Représentation schématique d'une boucle de chromatine rapprochant des séquences régulatrices distales et le promoteur d'un gène. Adaptée de Juven-Gershon and Kadonaga 2010

1.4.2.3.2. Boucles de chromatine

Le réarrangement chromatinien a été pour la première fois mis en avant par la découverte de la cis-régulation du gène de la β -globine sur une distance de 150 kb (Vernimmen et al 2007). Deux types de boucles ont été décrits. Le premier est une boucle qui rapproche le promoteur avec le terminateur (O'Sullivan et al 2004 ; Lainé et al 2009), important pour la réinitiation de la transcription (Voir partie 1.3.3).

Le deuxième type de boucle permet le rapprochement entre *enhancers* et promoteurs (Krivega and Dean 2012). Ces boucles ont été décrites pour être très dynamiques. Par exemple, elles peuvent être induites par une stimulation hormonale (Tan-Wong et al 2008) (Figure 13).

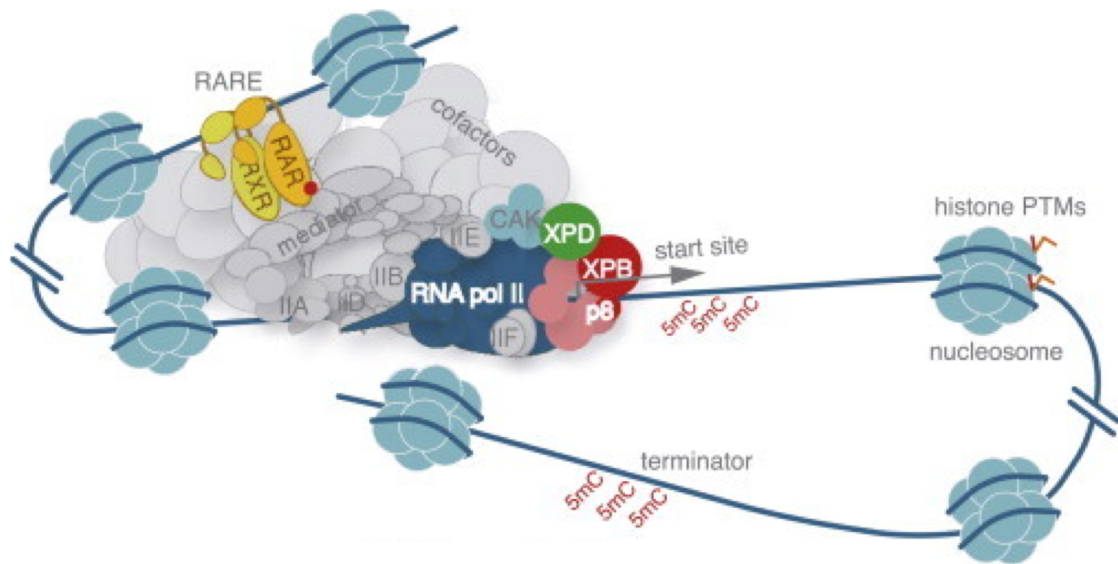


Figure 13 : Représentation d'une boucle de chromatine. Adaptée de Singh et al 2015

La liaison du récepteur à l'acide rétinoïque lié à son ligand sur son élément de réponse représentant un *enhancer* stimule l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle sur le promoteur du gène cible et la transcription de ce gène grâce à une boucle de chromatine.

Ces conformations de boucles sont maintenues par de nombreuses protéines. Parmi elles, la protéine CTCF (*CCCTC-binding factor*) est très importante et conservée au cours de l'évolution. Elle est décrite comme un organisateur de la chromatine, impliquée dans la mise en place d'interactions longues distances chez les vertébrés et les insectes (Handoko et al 2011). Deux copies de la protéine peuvent se lier aux séquences CPDD (*CTCF-Pair-Defined domain*) afin de les rassembler. Le facteur CTCF est impliqué dans l'activation ou la répression des gènes mais a aussi différentes fonctions comme le blocage d'*enhancers*, l'inactivation du chromosome X ou l'empreinte génétique. De plus, il a été trouvé interagissant avec Dnmt1 afin d'inhiber la méthylation de l'ADN. Cela montre que CTCF est capable d'organiser la conformation tridimensionnelle du génome et de diriger un large système de régulation de la transcription.

Une autre protéine découverte plus récemment a un rôle important dans la formation des boucles de chromatine, la protéine YY1 (*Yin and Yang 1*). YY1 pourrait de façon globale entraîner des interactions enhancer-promoteur par liaison à l'ADN et faciliter la formation des boucles de chromatine, probablement à travers sa dimérisation (Weintraub et al 2017).

2. Le complexe TFIIH

Le facteur de transcription IIH (TFIIH) a été caractérisé comme facteur général de la transcription de l'ARN polymérase II en 1989. Il a été initialement purifié à partir de foies de rats (Conaway and Conaway 1989) puis de cellules Hela (Gerard et al 1991) comme étant le facteur de transcription basique 2 (*basic transcription factor 2*). Puis à partir de levures, il a été isolé comme étant le facteur de transcription de l'ARN polymérase II b (*RNA polymerase II transcription factor b*) (Feaver et al. 1991, Kershner et al 1998). Ensuite la nomenclature universelle des facteurs généraux de la transcription l'a désigné comme étant le facteur de transcription IIH ou TFIIH.

Étant donné son rôle clé dans des processus cellulaires fondamentaux, TFIIH est un complexe très conservé à travers l'évolution. Toutes les sous-unités de TFIIH sont retrouvées dans des espèces eucaryotes variées comprenant les animaux, les plantes, les champignons et les eucaryotes unicellulaires (Compe and Egly 2016).

2.1. Composition de TFIIH

TFIIH est un complexe multiprotéique de dix sous-unités pouvant être subdivisé en deux sous-complexes : le « core » et le CAK (Cyclin-dependent kinase (CDK)-activating kinase) (Figure 14).

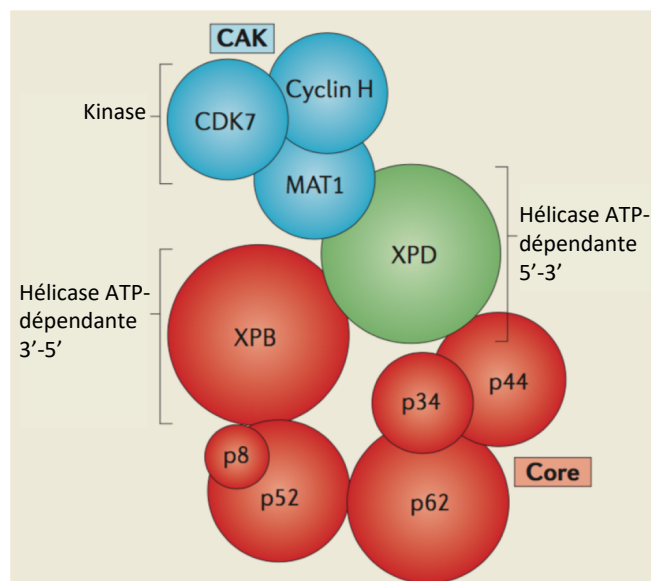


Figure 14 : Composition du complexe TFIIH. Adaptée de Compe and Egly 2012

Le « core » de TFIIH contient six sous-unités : XPB (*Xeroderma Pigmentosum group B*), p34, p44, p52, p62 et la plus petite sous-unité, découverte en dernier, p8/TTDA (Roy R et al 1994 ; Giglia-Mari et al 2004). Le complexe CAK est composé de trois sous-unités : MAT1 (Ménage A Trois 1), CDK7 et cycline H. Ces deux sous-complexes sont stabilisés et reliés entre eux par la sous-unité XPD (*Xeroderma Pigmentosum group D*), interagissant d'un côté avec p44 et de l'autre avec MAT1 (Coin et al 1998 ; Sandrock and Egly 2001). De plus, une autre protéine peut être considérée comme faisant partie du complexe TFIIH, l'endonucléase XPG (*Xeroderma Pigmentosum group G*) car celle-ci interagit fortement avec des sous-unités du core et est trouvée avec TFIIH à la fois dans la transcription et la réparation de l'ADN (Ito S et al 2007).

De plus CDK7 peut être retrouvé dans 3 différents complexes : le complexe CAK seul (50% de CDK7), le complexe CAK associé au reste du complexe TFIIH (40% de CDK7) et enfin le complexe CAK lié à XPD seul (10% de CDK7).

Sous-complexe	Homme	Levure	Fonction	Maladies génétiques humaines
"core"	XPB	Ssl2	Hélicase 3' vers 5' ATP-dépendante	TTD et XP-B/CS
	p62	Tfb1	Fonction structurelle et interagit avec des facteurs de transcription et facteurs NER	
	p52	Tfb2	Régule l'activité ATPase de XPB	
	p44	Ssl1	E3 ubiquitine ligase (levure)	
	p34	Tfb4	Fonction structurelle et forte interaction avec p44	
	p8	Tfb5	Régule l'activité ATPase de XPB	TTD
XPD	XPD	Rad3	Hélicase 5' vers 3' ATP-dépendante et forme un pont entre CAK et core	TTD, XP et XP-D/CS
CAK	CDK7	Kin28	Kinase	
	Cycline H	Ccl1	Module l'activité kinase de CDK7	
	MAT1	Tfb3	Stabilisation du CAK	

Tableau 4 : Les différentes sous-unités de TFIIH et leurs fonctions

TFIIH contient trois activités enzymatiques importantes : deux hélicases dépendantes de l'ATP avec XPB et XPD, bien que XPB n'agisse pas comme une hélicase conventionnelle mais plutôt comme une translocase à ADN double brin, et une activité kinase avec CDK7, ayant toutes des rôles notamment dans la transcription et dans la réparation par excision de

nucléotides (NER) (Tableau 4). En plus de ces activités enzymatiques, TFIIH contient aussi une activité ubiquitine ligase dans p44 mais a seulement été retrouvée chez la levure (Takagi et al 2005).

2.2. Structure de TFIIH

De nombreuses études structurales ont été réalisées afin de déterminer la structure de TFIIH (Schultz P et al 2000 ; Gibbons et al 2012 ; Greber et al 2017 ; He et al 2016 ; Murakami et al 2015 ; Schilbach et al 2017). Une des plus récentes a été menée dans le laboratoire de Dr. Eva Nogales avec une résolution de 3,7 Å (Greber et al 2019). Il est difficile d'obtenir une structure complète de TFIIH à cause de la grande flexibilité du CAK. C'est pourquoi dans cette dernière étude, CDK7 et cycline H ne sont pas représentés.

TFIIH a une structure en forme de fer à cheval (Figure 15). Les deux plus grosses sous-unités de TFIIH, XPB et XPD, interagissent ensemble et sont reliées entre elles par MAT1. Au côté opposé à MAT1, XPD interagit aussi avec le domaine *von Willebrand Factor A* (vWFA) de p44 (Coin et al 1998 ; Kim et al 2015) qui lui-même forme une faible interaction avec p34. Cette interaction XPD-p44 est très importante car elle permet à p44 de stimuler l'activité hélicase de XPD (Coin et al 2007). Le domaine vWFA de p44 recrute p52 par une interaction qui implique le domaine N-terminal de p52 et un segment de p62 (Schilbach et al 2017, Greber et al 2019).

La région C-terminale de p52 contient deux domaines : le « clutch » qui interagit avec l'extrémité N-terminal de XPB (Jawhari et al 2002) et un module de dimérisation qui se lie à p8 (Kainov et al 2008). Cette association XPB-p52-p8 est importante pour la régulation de l'activité ATPase de XPB. En effet p52 stimule cette activité en interagissant avec XPB et p8 module cette interaction, régulant indirectement l'activité ATPase de XPB (Coin et al 2006 ; Coin et al 2007).

Enfin p62 entoure complètement la surface supérieure de TFIIH, interagissant avec XPD, p52, p44 et p34 et est important pour la structure de TFIIH (Greber et al 2017, Greber et al 2019). Concernant le complexe CAK, CDK7 agit en collaboration avec son partenaire cycline H avec qui il interagit. Cette interaction est stabilisée par MAT1, le troisième membre du CAK (Devault et al 1995).

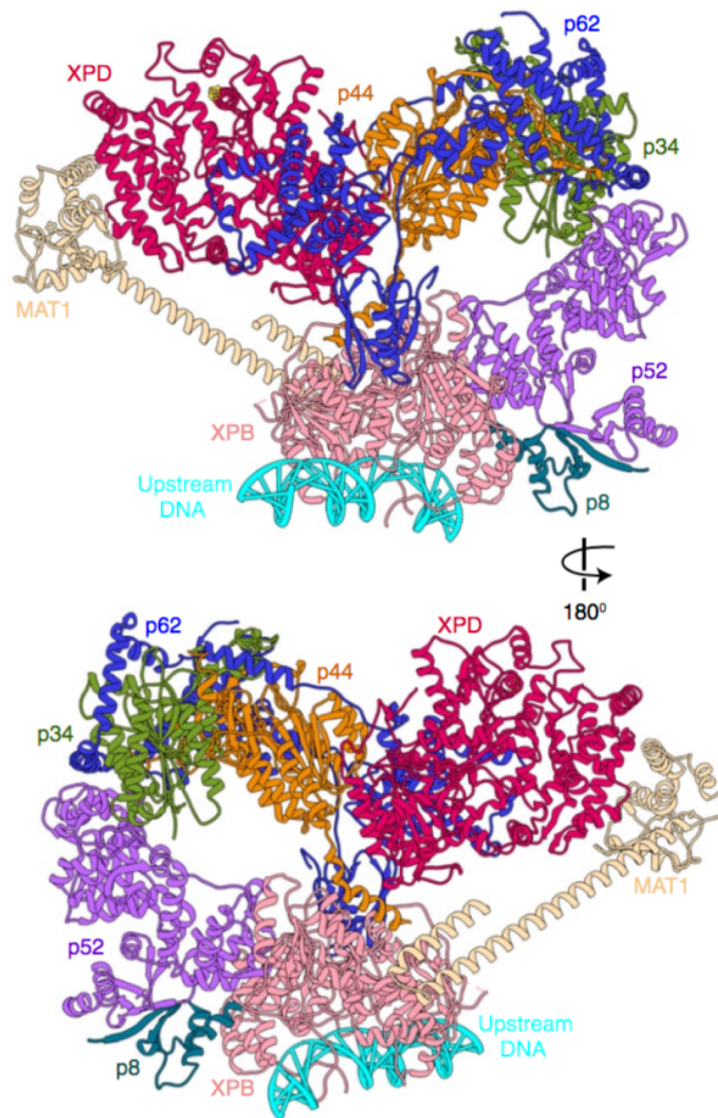


Figure 15 : Structures tridimensionnelles de TFIID. Adaptée de Yan et al 2019

2.3. Rôles de TFIID dans la transcription

TFIID est un facteur essentiel à l'initiation de la transcription. En effet après le recrutement de TFIID et la formation complète du PIC, une coopération entre XPB et CDK7 se met en place, l'activité enzymatique de XPD n'ayant pas de rôle dans l'étape d'initiation de la transcription. Cette coopération permet l'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur et l'échappement du promoteur (Figure 16).

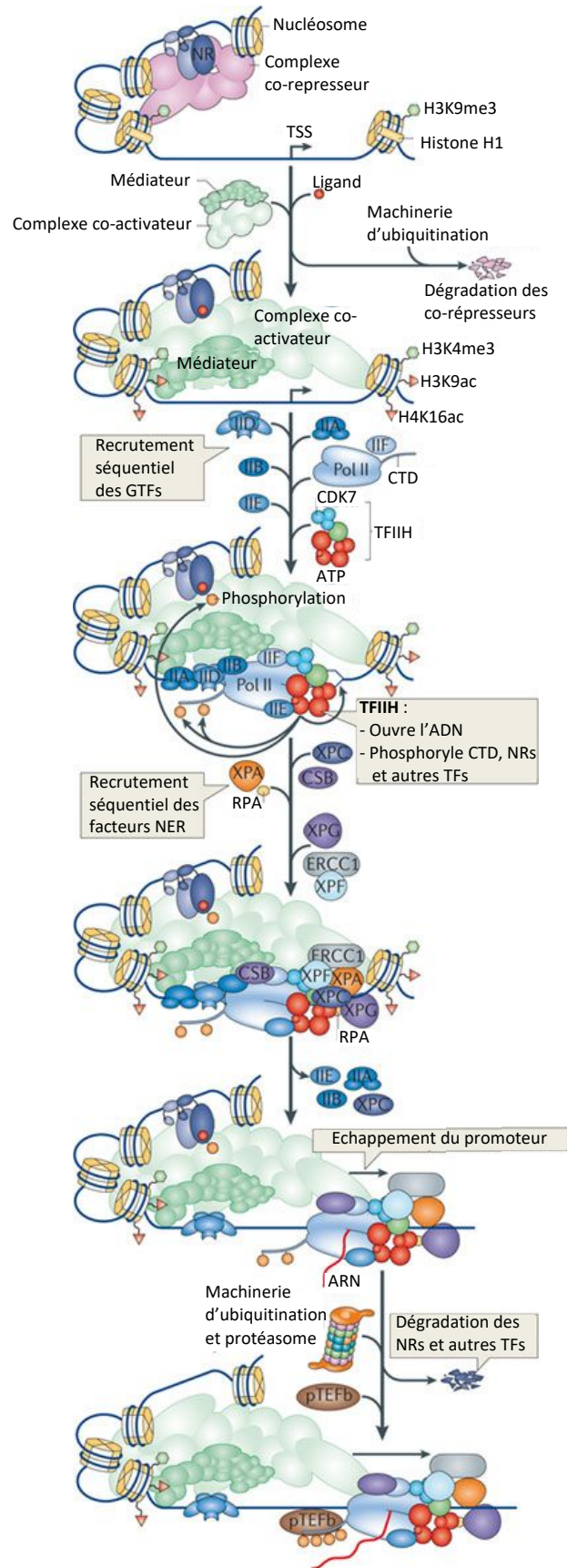


Figure 16 : Rôles de TFIIF dans l'initiation de la transcription. Adaptée de Compe and Egly

Pendant longtemps, l'activité hélicase ATP-dépendante de XPB a été considérée comme responsable de l'ouverture du promoteur (Holstege et al 1996 ; Coin et al 1999 ; Douziech et al 2000). Les hélicases sont des moteurs protéiques capables de catalyser transitoirement la séparation des deux molécules d'ADN en utilisant l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP. XPB correspond en réalité à une hélicase non conventionnelle, où elle agirait plutôt comme une translocase dont l'activité permet l'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur sans directement briser les liaisons entre les nucléotides de chaque brin comme le ferait une hélicase classique. Les premières découvertes remettant en cause le rôle de XPB en tant qu'hélicase ont été réalisées au laboratoire où une forme ultra-pure de TFIIH ne présentait pas d'activité hélicase 3'->5' malgré la présence de XPB (Coin et al., 1998). Puis, chez la levure il a été montré que des mutations dans les domaines hélicases de XPB ne perturbaient pas l'activité transcriptionnelle de TFIIH. Ensuite, une activité translocase ATP-dépendante a été découverte dans XPB (Fishburn et al 2015) puis une autre étude a montré que TFIIH rendait instable la forme ouverte du PIC (Plaschka et al 2016). Enfin, il a été montré récemment que la transcription des ARNm chez l'Homme ou chez la levure pouvait intervenir sans XPB (Alekseev et al 2017 ; Dienemann et al 2019). Un modèle est désormais proposé où XPB empêche l'ouverture naturelle du promoteur lors de la formation du PIC. L'activité translocase de XPB lui permet, lorsque le PIC est formé, de se déplacer en amont du TSS, initiant ainsi l'ouverture naturelle du promoteur sans activité hélicase (Voir partie 1 des résultats).

Après la formation du complexe ouvert, la transcription est initiée et dépend de l'état de phosphorylation du CTD de Pol II. C'est à ce moment que CDK7, grâce à son activité kinase a un rôle essentiel. En effet, CDK7 phosphoryle Ser-5 du CTD permettant ainsi l'échappement du promoteur (Serizawa et al 1993). Cela facilite également l'association de Pol II avec la machinerie de la coiffe de l'ARN (Cho et al 1997). CDK7 phosphoryle aussi la Ser-7 du CTD (Akhtar et al 2009), ce qui semble être important pour le splicing des ARNs (Egloff et al 2007). L'activité kinase de CDK7 est stimulée par le médiateur, qui se lie avec Pol II dont le CTD n'est pas phosphorylé et aide au recrutement de Pol II au niveau du PIC. La phosphorylation de Ser-5 et Ser-7 du CTD par CDK7 perturbe l'interaction avec le médiateur et permet ainsi l'échappement du promoteur et l'entrée dans la phase d'élongation (Kim et al 2009 ; Wong et al 2014). Cependant, il a été montré chez la levure que Kin28 (CDK7) n'était pas indispensable pour l'élongation mais qu'elle contrôlerait aussi la phosphorylation

de la Ser-2 par CDK9 en activant CDK9 par phosphorylation (Larochelle et al 2012). L'activité kinase de CDK7 est modulée par différents facteurs incluant MAT1 (Ménage à trois 1) et cycline H (Adamczewski et al 1996 ; Rossignol et al 1997). Une fois que Pol II a été phosphorylée par CDK7, il y a un départ séquentiel de TFIIH et TFIIIE. Le sous-complexe CAK accompagné de TFIIIE α ne sont plus requis au niveau du promoteur et sont libérés, puis ils sont suivis par le core de TFIIH et de TFIIIE β , alors que les facteurs d'élongation prennent place afin de poursuivre la transcription (Compe et al 2019).

2.4. Drogues ciblant les activités de TFIIH

Les cellules cancéreuses sont hyper prolifératives et requièrent un haut niveau de transcription afin de maintenir leur phénotype malin. Ainsi, les composants de la machinerie transcriptionnelle et d'autres protéines impliquées dans le contrôle de la transcription sont considérés comme des cibles efficaces afin de réduire la transcription globale, qui pourrait avoir un effet plus important sur les cellules cancéreuses que sur les cellules non cancéreuses.

C'est pourquoi ces dernières années, de nouvelles molécules ont été découvertes comme agissant spécifiquement sur des sous-unités de TFIIH afin de moduler leur activité enzymatique.

La première molécule est le THZ1 qui agit sur l'activité kinase de CDK7. En effet, THZ1 est un inhibiteur hautement spécifique de CDK7 en formant une liaison covalente avec le résidu 312 de CDK7, qui se trouve en dehors du site actif, d'où sa haute spécificité (Kwiatkowski et al 2014). THZ1 a été identifié comme un inhibiteur efficace dans des modèles précliniques de tumeurs malignes tels que la leucémie lymphoblastique aigüe à cellule T (Kwiatkowski et al 2014), le carcinome du poumon à petites cellules (Christensen et al 2014), le neuroblastome (Chipumuro et al 2014) et le cancer du sein triple négatif (Wang et al 2015). Une récente étude a aussi identifié THZ1 comme pouvant être une approche efficace contre le cancer de l'ovaire MYC-dépendant (Zeng et al 2018).

Une deuxième molécule agissant sur TFIIH est le triptolide, et sa prodrogue soluble dans l'eau appelée minnelide (Chugh et al 2012 ; Titov et al 2011). Le triptolide est un diterpène epoxide produit de façon endogène dans la vigne du tonnerre divin (*Tripterygium wilfordii*),

utilisé dans la médecine chinoise traditionnelle. Il agit en modifiant de façon covalente un résidu cystéine situé dans le site actif de XPB et inhibe son activité ATPase. Son action conduit donc à l'inhibition de la transcription médiée par l'ARN polymérase II et de la réparation NER (He et al 2015). Le triptolide et sa prodrogue ont montré qu'ils amélioraient l'effet cytotoxique d'autres agents chimiothérapeutiques comme les dérivés du platine, dans des cancers variés incluant les cancers de la vessie, ovarien ou du pancréas (Chugh et al 2012 ; Ho et al 2015 ; Zhong et al 2013). Par exemple, une combinaison de doses faibles de minnelide et d'oxaliplatine a montré qu'elle inhibait de façon significative la prolifération des cellules cancéreuses dans un modèle murin orthotopique de cancer pancréatique. Cet effet est provoqué par la suppression de la réparation des dommages à l'ADN induits par l'oxaloplatine, normalement réparés par NER (Modi et al 2016).

Enfin, la spironolactone (SP) est la dernière molécule agissant sur TFIIH. Elle correspond à un antagoniste de l'aldostérone qui se lie aux récepteurs des minéralocorticoïdes. Il a été découvert dans notre laboratoire que SP a la capacité d'induire la dégradation rapide et réversible par le protéasome de la translocase XPB (Alekseev et al 2014). Cependant le mécanisme d'action de SP n'est pas encore connu mais l'activité kinase de CDK7 serait requise pour ce processus (Ueda et al 2019). Une combinaison de SP avec des dérivés de platine produit une augmentation significative de la cytotoxicité pour des cellules de carcinomes humains du côlon et de l'ovaire (Alekseev et al 2014).

3. Le mécanisme NER

Tout au long de la vie, l'ADN génomique est exposé à un grand nombre d'attaques génotoxiques endogènes ou exogènes. En effet, les radicaux formés par des réactions d'oxydation, les rayons UV, la fumée de cigarette ou encore des produits chimiques environnementaux sont capables d'altérer l'intégrité du génome et de créer des lésions dans l'ADN. Ces lésions doivent absolument être réparées afin de ne pas perturber des processus essentiels à la cellule comme la transcription ou la réplication de l'ADN. L'absence de réparation peut conduire à la transformation de la cellule ou à l'apoptose.

Différents mécanismes de réparation existent, agissant sur certains types spécifiques de lésions. Le mécanisme d'intérêt dans ce manuscrit est le mécanisme de réparation par excision de nucléotides ou mécanisme NER.

TFIIH est un complexe essentiel pour le bon déroulement du mécanisme NER. Comme nous nous intéressons surtout ici au côté transcriptionnel de TFIIH, seule une brève description du mécanisme NER sera effectuée.

3.1. Les étapes successives de NER

Le mécanisme NER est principalement engagé dans la suppression des dimères de pyrimidine (CPD) et les 6-4 pyrimidine pyrimidones (6-4PP) qui sont les principales lésions de l'ADN induites par les rayons UV. Il est aussi responsable de la suppression des adduits d'ADN volumineux induits par des hydrocarbures aromatiques polycycliques et les agents anti-cancéreux (Mocquet et al 2007).

Il existe deux voies dans ce mécanisme de réparation : la réparation couplée à la transcription ou TC-NER et la réparation du génome entier ou GG-NER. Ces deux voies consistent à la formation d'un complexe de pré-incision au niveau de la lésion mais différent au niveau de la reconnaissance de cette lésion.

3.1.1. Reconnaissance de la lésion

Comme son nom l'indique, la GG-NER agit sur la totalité du génome pour trouver des lésions afin d'initier leur réparation. Dans cette voie les lésions sont reconnues par la protéine XPC (*Xeroderma Pigmentosum group C*) contenue dans un complexe trimérique avec ses partenaires HR23B (*Homologue Rad 23 B*) et Centrine 2 (CETN2) (Figure 17) (Araki et al 2001 ; Masutani et al 1994). Le duplexe XPC-HR23B est suffisant pour une réaction NER *in vitro* et CETN2 stimule fortement cette réaction *in vivo* (Araujo et al 2000 ; Nishi et al 2005).

Les photoproduits et les adduits chimiques induisent une distorsion de l'ADN et c'est cette distorsion qui est reconnue par XPC (Sugasawa et al 2001). C'est pourquoi certaines lésions déformant faiblement l'ADN sont difficilement identifiables par le complexe XPC/HR23B/CETN2. Ainsi, les lésions 6-4PPs qui induisent une courbure de 44° de la molécule d'ADN, sont réparées plus rapidement que les lésions CPD, qui induisent une légère courbure de 15° (Reardon and Sanchar 2003). Dans ce cas, le dommage est d'abord reconnu par XPE/DDB2 (*DNA Damage Binding protein 2*) qui forme un complexe avec DDB1.

Ce complexe DDB augmente la distorsion de l'ADN et ainsi aide au recrutement de XPC (Fitch et al 2003). DDB2 aurait aussi un rôle dans la décondensation de la chromatine au niveau de la lésion, qui serait dépendante de l'hydrolyse de l'ATP et de l'action de PARP (Luijsterburg et al 2012). Une fois la lésion reconnue, XPC recrute le complexe TFIIH (Ziani et al 2014) (Figure 17).

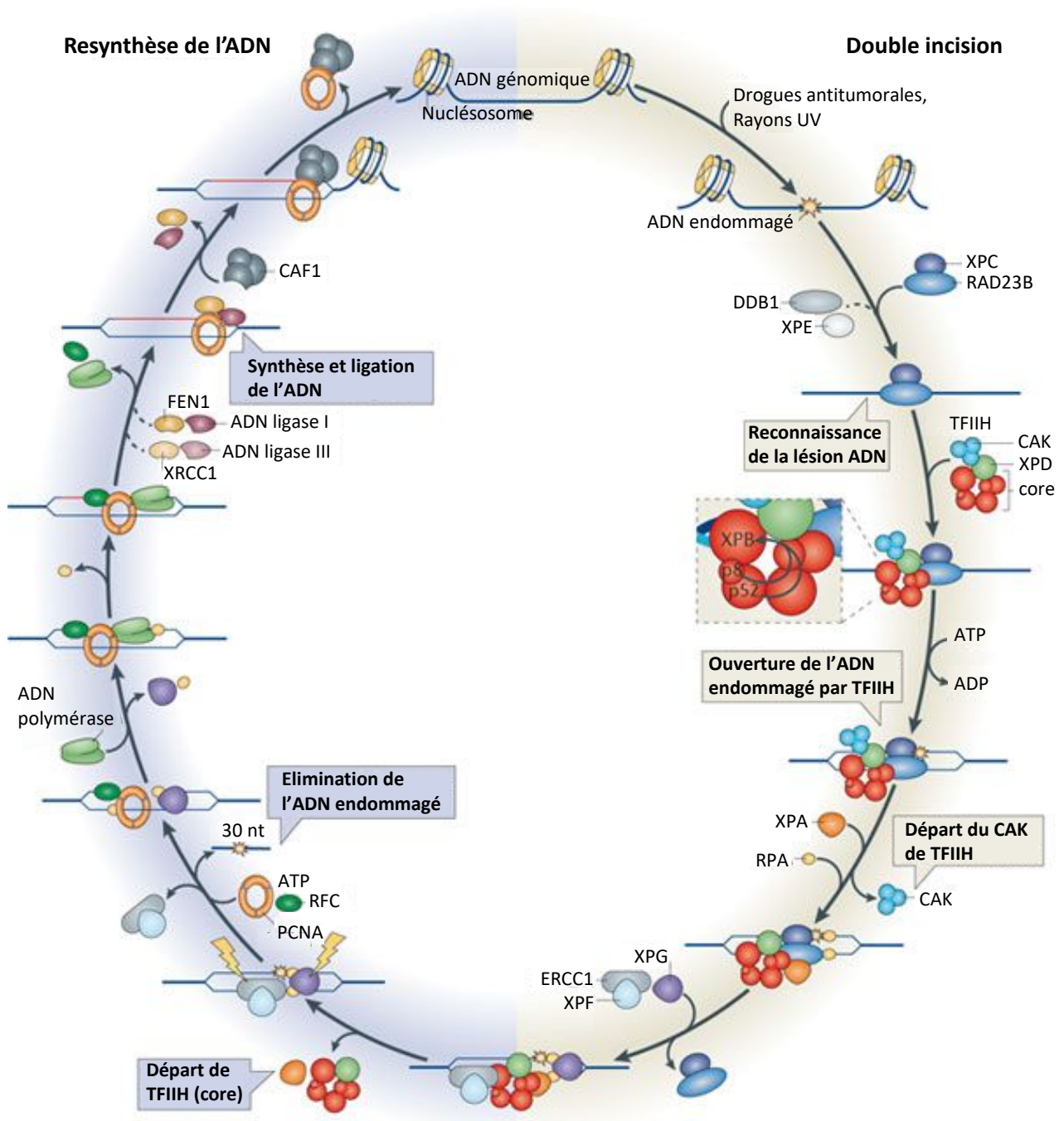


Figure 17 : Les étapes successives du mécanisme de réparation par excision de nucléotides.

Adaptée de Compe and Egly 2012

La TC-NER est dédiée à la réparation de lésions présentes sur un brin d'ADN transcrit (Hu et al 2015). Elle survient rapidement quand la Pol II est bloquée sur l'ADN par la lésion pendant le processus de transcription. Dans ce contexte, XPC et les protéines DDB ne sont pas utiles. L'arrêt de Pol II sur le dommage renforce son interaction avec la protéine CSB (*Cockayne Syndrome complementation group B*) (van den Boom et al 2004). CSB est stabilisée par sa déubiquitination par USP7 (Schwertman et al 2013). A partir de là, CSB lie fortement l'ADN et altère l'interaction Pol II/ADN (Beerens et al 2005). Il induit le recrutement du complexe CSA contenant notamment Cul4 (Fousteri et al 2006) qui ubiquitinera CSB après la restauration de l'intégrité du génome pour permettre sa dégradation par le protéasome (Groisman et al 2006). CSB entraîne aussi le recrutement de TFIIH et des autres facteurs NER.

3.1.2. Ouverture de l'ADN

TFIIH est donc recruté par XPC ou CSB au niveau de la lésion. En plus de son rôle dans la transcription, TFIIH montre une dualité fonctionnelle du fait de son rôle essentiel dans le mécanisme NER. En effet, XPB et XPD sont requis pour l'ouverture de l'ADN au niveau de la lésion.

Cette ouverture de l'ADN a longtemps été considérée comme l'action opposée des deux hélicases XPB et XPD (Bootsma and Hoeijmaker 1993, Schaeffer L et al 1993). En effet, des mutations dans le site de liaison à l'ATP de ces protéines inhibent la NER *in vivo* et *in vitro* (Guzder et al 1994 ; Sung et al 1988) à cause d'un défaut d'ouverture de l'ADN endommagé (Coin et al 2006). Cependant, ces études utilisaient des mutants dans le motif hélicase I, lieu de l'activité ATPase, mais pas dans les autres motifs hélicase. Cette hypothèse est remise en cause par des données obtenues dans notre laboratoire suggérant que seule l'activité hélicase de XPD a un rôle dans l'ouverture. La protéine XPB, grâce à son activité ATPase, serait responsable de l'ancrage de TFIIH sur l'ADN (Oksenych et al 2009). L'activité hélicase de XPD est alors responsable du déroulement de la double hélice et de l'ouverture asymétrique de l'ADN de part et d'autre de la lésion (Coin et al 2007) (Figure 17). De plus, XPD participe à la vérification du dommage (Mathieu et al 2010).

Une fois les brins autour de la lésion séparés, la protéine RPA se lie au niveau du brin non endommagé afin de le protéger, de stabiliser la structure ouverte (Volker et al 2001) et de permettre l'arrivée de XPA. En effet, RPA est acétylé par GCN5/PCAF et cette acétylation

favorise l'interaction XPA-RPA et augmente la rétention de XPA au site du dommage (He et al 2017 ; Zhao et al 2017).

Il est intéressant de noter que le complexe CAK de TFIIH semble interférer avec le mécanisme NER et nécessite d'être supprimé du complexe de pré-incision. Ainsi, XPA catalyse le détachement du complexe CAK du core de TFIIH permettant d'éliminer ce frein pour le mécanisme NER (Coin et al 2008) (Figure 17). Cela pourrait expliquer la dualité de ce complexe où comment un seul complexe est capable de participer à la fois à la transcription et à la réparation de l'ADN.

3.1.3. Incision de l'ADN

XPA favorise le recrutement de l'endonucléase XPF-ERCC1 et XPG est recruté par TFIIH, conduisant au départ de XPC. L'endonucléase XPG incise le brin endommagé à l'extrémité 3' de la boucle ouverte et induit le clivage en 5' par XPF-ERCC1. Il en résulte la libération d'un court oligonucléotide de 24 à 32 pb, contenant la lésion (Riedl et al 2003).

3.1.4. Resynthèse

Après la double incision, seule RPA reste sur le brin non endommagé puis il y a le recrutement du facteur de processivité PCNA et de RFC. XPF est ensuite libéré et RPA, XPG, RFC et PCNA permettent le recrutement de l'ADN polymérase δ ou ϵ . Après le départ de XPG et RPA, la synthèse du brin complémentaire est réalisée, utilisant le brin non endommagé comme matrice (Aboussekhra et al 1995 ; Moser et al 2007) (Figure 17).

3.1.5. Ligation

Après la synthèse du brin, une protéine ligase effectue la ligation de l'ADN. La ligase impliquée, tout comme l'ADN polymérase, semble dépendre de l'état du cycle cellulaire. Le couple Pol δ et ligase III α est en charge de la synthèse et de la ligation à travers le cycle cellulaire, alors que Pol ϵ et ligase I sont impliqués dans les cellules quiescentes (Moser et al 2007) (Figure 17).

3.2. Les maladies génétiques associées à un défaut de NER

Des mutations dans des gènes codant pour des protéines associées au mécanisme NER sont responsables de différents syndromes, appelés maladies génétiques de la réparation associées à une photosensibilité. En effet, ces mutations génétiques mènent à une déficience totale ou partielle des voies NER impliquées dans l'élimination des lésions UV. Il existe différentes maladies génétiques de la réparation (Figure 18). Les 3 principales sont le *Xeroderma pigmentosum* (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et la trichothiodystrophie (TTD).

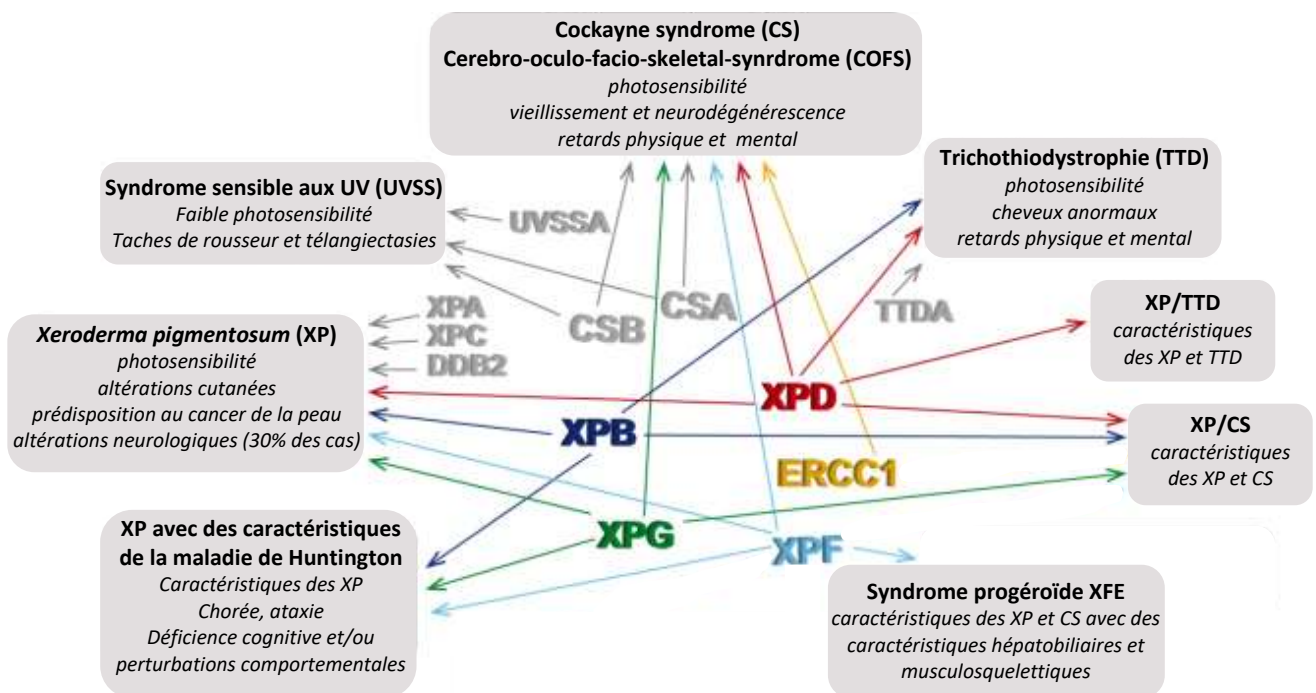


Figure 18 : Les différentes maladies génétiques de la réparation. Adaptée de Ferri et al 2019

3.2.1. Xeroderma pigmentosum

Le *Xeroderma pigmentosum* (XP) est la première pathologie à avoir été découverte en lien avec une déficience dans la réparation de l'ADN (Cleaver 1968). C'est une maladie génétique rare autosomale récessive. Les patients XP sont généralement décrits par une photosensibilité, un vieillissement prématuré de la peau, des changements pigmentaires et un niveau très élevé de développer un cancer de la peau (Tableau 5). En effet, ils ont un

risque augmenté pour le cancer de la peau, mais aussi des yeux et de la langue. A un âge inférieur à 20 ans, les patients XP peuvent avoir une fréquence de cancer de la peau hors mélanome augmentée de 10000 fois et de mélanome augmentée de 2000 fois (Kraemer et al 1994 ; Bradford et al 2011). De plus, ils souffrent d'une incidence légèrement plus élevée pour les cancers internes. Environ 30% d'entre eux développent une dégénérescence neurologique progressive (Mangelsdorf and Evans 1995 ; Rapin 2013) (Figure 18).

Il existe sept groupes de XP, nommés de XP-A à XP-G, suivant la protéine qui est impactée par la mutation de son gène. Les patients XP-C et XP-E ont une déficience unique dans la GG-NER étant donné l'absence de rôle de XPC et XPE dans la TC-NER, alors que les cinq autres groupes (XP-A, XP-B, XP-D, XP-F et XP-G) ont une déficience dans la GG-NER et la TC-NER.

De plus un huitième groupe de XP a été décrit, appelé XP variant ou XP-V. Les patients XP-V ne sont pas concernés par une mutation dans une des protéines du mécanisme NER. En effet, ils ont une mutation dans le gène codant pour l'ADN polymérase ϵ , responsable de la synthèse translésionnelle qui a lieu au cours de la réplication de l'ADN en cas de présence d'une lésion UV (Johnson et al 1999). Cette mutation induit aussi une photosensibilité et des cancers de la peau.

3.2.2. Syndrome de Cockayne

Le syndrome de Cockayne (CS) a été décrit pour la première fois en 1936 par le physicien anglais Edward Alfred Cockayne chez deux frères, comme étant un syndrome de nanisme, d'atrophie rétinienne et de surdité. Les patients atteints de CS présentent principalement des troubles neurologiques et développementaux avec une durée de vie très réduite, mais ne présentent pas de prédisposition au cancer (Nance and Berry 1992). L'exposition aux UV induit des érythèmes et une inflammation sévère chez ces patients, bien que des cas de CS sévères sans photosensibilité aient déjà été observés (Colella et al 1999) (Tableau 5).

Il y a deux groupes CS connus, CS-A et CS-B, impliquant des protéines de la voie TC-NER. Cela explique l'incapacité des cellules CS de rétablir la transcription après une exposition aux UV, alors que la voie GG-NER n'est pas affectée (Cleaver et al 2009).

Différents syndromes sont englobés dans le CS, avec différents degrés de sévérité (Figure 18): le syndrome UVSS (UV-sensitive syndrome) ayant pour seul phénotype la

photosensibilité ; les syndromes CS I et CS II, présentant un nanisme cachectique, une rétinopathie, une microcéphalie, une surdité, des troubles neurologiques, une démyélinisation, une calcification ganglionnaire et des retards de croissance et du développement après la naissance ; et pour finir le très sévère syndrome de COFS (cérébro-oculo-facio-squelettique) induisant la mort néonatale (Nance and Berry 1992).

3.2.3. *Xeroderma pigmentosum* combiné au syndrome de Cockayne

Le *Xeroderma pigmentosum* combiné au syndrome de Cockayne (XP/CS) est un phénotype rare avec des caractéristiques cliniques de XP et CS (Lindenbaum et al 2001). En plus du retard mental, de l'hypogonadisme, de la petite taille, les patients XP/CS ont la caractéristique de prédisposition au cancer de la peau des XP (Tableau 5). Cette association XP et CS peut être due à des mutations dans le gène de trois protéines différentes : XPB (XP-B/CS), XPD (XP-D/CS) et XPG (XP-G/CS).

3.2.4. Trichothiodystrophie

La trichothiodystrophie (TTD) est une maladie génétique rare autosomale récessive décrite pour la première fois dans les années 70-80 (Pollitt et al 1968 ; Price et al 1980). Les patients atteints de TTD montrent une déficience intellectuelle avec une transmission héréditaire. Le diagnostic le plus simple est la présence de cheveux dispersés et cassants ainsi que des ongles cassants, présents dans la plupart des patients TTD. Ils peuvent aussi être atteints de photosensibilité, d'ichtyose, de fertilité diminuée et être de petite taille (Itin et al 2001) (Figure 18 et Tableau 5).

Plusieurs groupes de TTD ont été identifiés selon les gènes affectés et la réponse cellulaire aux UV : une forme non photosensible (Botta et al 2007) et des formes photosensibles plus sévères causées par des mutations dans XPB, XPD et TTDA (TTD-B, TTD-D et TTD-A), caractérisées par une baisse de 70% du taux cellulaire de TFIIH (Botta et al 2002 ; Giglia-Mari et al 2004). Des études cellulaires ont montré que la forme photosensible est due à un défaut de NER similaire au XP et au CS, alors que la forme non photosensible montre une

NER normale (Stefanini et al 1986). Des mutations dans XPD ont aussi été rapportées comme étant responsables de patients montrant une combinaison de XP et de TTD.

Récemment, quelques mutations dans TFIIIE ont été montrées comme étant à l'origine de TTD non photosensible (Kuschal et al 2016), en induisant des perturbations dans la phosphorylation de Pol II par le CAK lors de l'initiation de la transcription (Compe et al 2019).

Caractéristiques	XP	TTD	CS	XP/CS
Peau				
Sensibilité au soleil	oui	oui/non	oui	oui
Pigmentation lentigineuse	oui	non	non	oui
Cancer induit par la lumière du soleil	oui	non	non	oui
Yeux				
Photophobie	oui	oui/non	oui	oui
Cancer (oeil antérieur/paupière)	oui	non	non	-
Cataracte congénitale	non	oui	oui	non
Dégénérescence rétinienne pigmentaire	non	non	oui	oui
Somatique				
Petite taille	non	oui	oui	oui
Développement sexuel immature	non	oui/non	oui	oui
Système nerveux				
Surdité sensorineurale progressive	non	non	oui	oui
Retard développemental	non	oui	oui	oui
Démyélinisation de cerveau	non	oui	oui	oui
Dégénérescence neurologique progressive	non	-	oui	oui
Atrophie	non	oui/non	oui	oui
Calcification	non	oui/non	oui	oui
Mécanisme de la maladie				
Défaut NER	oui	oui	oui	oui
Réaction aux agents endommageant l'ADN	oui/sévère	non	oui	oui
Défauts moléculaires	XP A-G, XPV	XPB, XPD, p8	CSA, CSB	XPB, XPD, XPG

Tableau 5 : Caractéristiques phénotypiques des principales maladies génétiques de la réparation. Adapté de DiGiovanna and Kraemer 2012

3.2.5. Etiologie

La photosensibilité et le risque accru de développer des cancers de la peau sont clairement expliqués par un défaut de réparation de l'ADN. En effet, les mutations dans les

facteurs NER impactent fortement la TC-NER et/ou la GG-NER. Néanmoins, des caractéristiques cliniques fortes comme le défaut neurodéveloppemental, la déficience intellectuelle ou le nanisme ne peuvent être expliqués par le défaut de réparation. Alors que ces différents syndromes ont d'abord été caractérisés comme des maladies de la réparation de l'ADN, les études récentes tendent à suggérer que certaines de leurs caractéristiques font suite à des défauts transcriptionnels (Brooks 2013 ; Compe and Egly 2016). De plus certains facteurs NER, en plus de TFIIH, ont été découverts comme participant à la transcription, notamment dans le remodelage de la chromatine ou de la méthylation de l'ADN au niveau des régions promotrices (Le May et al 2010a).

3.3. Dualité des facteurs NER

La transcription des gènes de classe II est un processus fondamental des cellules, menée par l'ARN polymérase II avec l'aide de plusieurs complexes comprenant des remodeleurs de la chromatine, des facteurs de transcription, des cofacteurs et les facteurs généraux de transcription. Ainsi la matrice ADN doit être maintenue sans dommages, qui pourraient altérer la transcription. Toutes les lésions doivent alors être réparées lorsque la transcription est bloquée sur l'une d'entre elles. Cela suggère un lien fonctionnel entre transcription et réparation de l'ADN.

Hormis TFIIH pour lequel la dualité fonctionnelle est bien établie, des études plus récentes ont montré cette dualité pour d'autres facteurs NER. La compréhension du rôle de ces facteurs dans la transcription est une clé dans la compréhension des maladies génétiques liées à la réparation.

Comme mentionné précédemment, le facteur XPG stabilise le complexe TFIIH dans le contexte de la transcription et est parfois considéré comme la onzième sous-unité de TFIIH. Il est requis pour la transcription dont l'activation est associée aux récepteurs nucléaires (Ito et al 2007). Une étude suggère aussi que le complexe XPG-TFIIH pourrait jouer un rôle comme facteur d'élongation (Narita et al 2015). Enfin il a été montré que XPG joue un rôle dans la déméthylation de l'ADN (Barreto et al 2007).

Les facteurs XPG et XPF sont impliqués dans la formation de boucles promoteur-terminateur pour une transcription efficace. En effet, XPG provoque des cassures de l'ADN et la

déméthylation de l'ADN au niveau du promoteur afin de permettre le recrutement de CTCF et la boucle du gène (Le May et al 2012).

De plus, une étude a montré que le complexe ERCC1-XPF interagit avec CTCF et la cohésine afin de faciliter la répression durant le développement des gènes soumis à empreinte (Chatzinikolaou et al 2017).

Le facteur XPA jouerait un rôle dans l'expression d'un petit groupe de gènes importants pour les fonctions mitochondriales et le métabolisme des hormones stéroïdiennes, pouvant expliquer des problèmes neurologiques et la stérilité observés chez des patients *Xeroderma pigmentosum* (Manandhar et al 2017).

Enfin le facteur XPC a un rôle indéniable durant la transcription (Le May et al 2010b). En effet il a été montré que XPC, en absence d'attaque génotoxique, est retrouvé lié au promoteur de gènes actifs après le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. L'arrivée de XPC sur le promoteur de ces gènes actifs conduit au recrutement séquentiel d'autres facteurs NER incluant XPA, RPA, XPG et XPF-ERCC1 (Figure 16). Même si ces facteurs ne sont pas essentiels à la formation du PIC, ils permettent tout de même d'optimiser l'efficacité de la transcription.

Une autre étude a mis en évidence la capacité de XPC à réguler la déméthylation de l'ADN dépendante de la glycosylase TDG, à la fois dans des cellules souches et somatiques mais aussi dans le contexte de reprogrammation cellulaire pour générer des cellules iPS (Ho et al 2017).

Pour finir, une récente étude menée dans notre laboratoire a montré un rôle de XPC dans le remodelage de la chromatine via KAT2A (Bidon et al 2018). En effet, la suppression de XPC dans les cellules utilisées dans cette étude entraîne la sous-expression de gènes spécifiques en raison d'une baisse de l'acétylation de la lysine 9 des histones H3 et de la formation du PIC. En réalité, XPC interagit avec l'histone acétyltransférase KAT2A et est responsable du recrutement du complexe ATAC contenant KAT2A sur le promoteur de ces gènes sous-exprimés. XPC interagit aussi avec le facteur de transcription E2F1 et favorise sa liaison avec son élément ADN. Le facteur XPC est donc un cofacteur de Pol II, recrutant le complexe coactivateur ATAC sur le promoteur grâce à son interaction avec le facteur de transcription E2F1.

4. La sous-unité XPB

La principale sous-unité de TFIIH sur laquelle se sont portées les études au cours de ma thèse est la sous-unité XPB (voir partie résultat). Une description spécifique de cette protéine est donc réalisée dans cette partie.

4.1. Structure de XPB

La protéine XPB (ERCC3 ; Ssl2 ; Rad25) est la plus grosse sous-unité de TFIIH, composée de 782 acides aminés. Elle appartient à la superfamille SF2 des hélicases dépendantes de l'ATP (Weeda et al 1990a). Elle est essentielle à la fois dans l'initiation de la transcription par Pol II et la réparation NER, sa fonction étant conservée chez les eucaryotes.

La structure cristallographique de l'homologue de XPB chez *Archaeoglobus fulgibus* (AfxPB) est la seule structure entière de TFIIH. Elle a révélé que les sept motifs hélicase de XPB étaient répartis en deux domaines hélicase HD1 et HD2 (*Rec-A like domains*) (Fan et al 2006) (Figure 19). Ces domaines sont reliés entre eux par une partie protéique flexible, contenant notamment les deux motifs RED et Thumb (ThM), importants dans la réparation NER (Oksenyich et al 2009). L'activité ATPase de XPB est localisée au niveau du motif I (Ma et al 1994a), important pour le rôle de XPB dans la réparation NER et la transcription de l'ADN.

La protéine XPB humaine contient une longue extrémité N-terminale (NTD), beaucoup plus longue que dans AfxPB, qui est une particularité par rapport aux autres hélicases SF2 mais dont le rôle reste à élucider (Figure 19). Suite à la structure de AfxPB, un domaine de reconnaissance du dommage (DRD) avait été retrouvé dans cette extrémité (Fan et al 2006), qui aurait donc pu avoir un rôle dans la vérification du dommage lors du mécanisme NER. Cependant une étude menée dans notre laboratoire a montré que ce n'était pas le cas (Oksenyich et al 2009), laissant cette extrémité sans rôle connu alors qu'elle forme un domaine bien défini et structuré et que deux des trois substitutions d'acide aminés retrouvées chez des patients XP-B (F99S et T119P chez des patients XP/CS et TTD respectivement) sont présentes dans cette extrémité (Figure 19) (voir partie 4.3). Ce NTD a fait l'objet d'une étude au cours de ma thèse (partie 2 des résultats) dans laquelle il a été

démonstré que ce domaine a un rôle important dans le remodelage de la chromatine durant l'initiation de la transcription en modulant l'activité enzymatique de l'histone acétyltransférase KAT2A (Sandoz et al 2019).

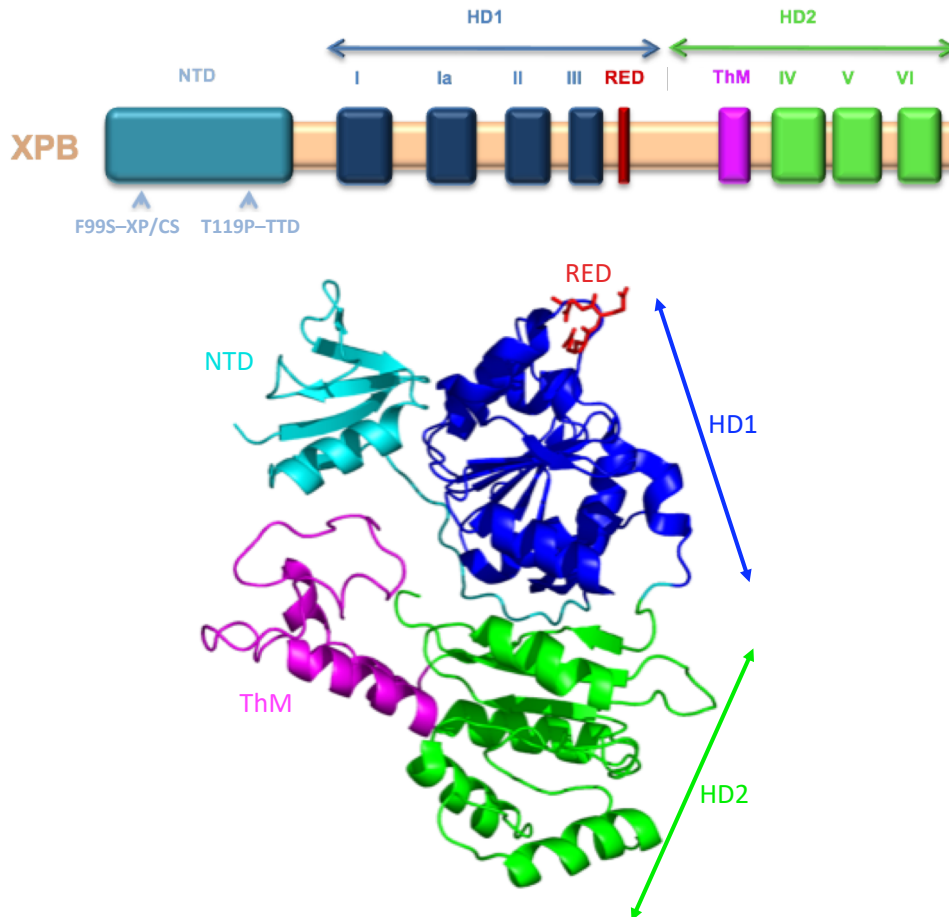


Figure 19 : Composition (haut) et structure cristallographique (bas) de XPB. Adaptée de Oksenysh et al 2009

4.2. Rôles de XPB

4.2.1. Dans la transcription

Comme mentionné précédemment, le rôle de XPB dans la transcription a été redéfini ces dernières années. En effet, XPB a un rôle dans l'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur. Cette ouverture a été pendant longtemps considérée comme étant le résultat de l'activité hélicase de XPB.

Cependant, plusieurs études ont remis en cause ce dogme. Premièrement, l'activité hélicase de XPB *in vitro* est très faible par rapport à d'autres hélicases comme XPD, alors qu'il a une forte activité ATPase (Coin et al 1998). Ensuite des études ont montré que seule l'activité ATPase de XPB était essentielle à l'ouverture du promoteur (Lin et al 2005). Cette ouverture pouvait avoir lieu en absence de TFIIH chez la levure (Plaschka et al 2016) où TFIIH serait même responsable de rendre le PIC ouvert instable. De plus, il a été démontré que XPB ne se situe pas au niveau de la région à ouvrir (-9/+2 par rapport au TSS) mais en aval (+10/+20), ce qui n'est pas compatible avec son action en tant qu'hélicase ouvrant l'ADN autour du promoteur (Kim et al 2000 ; Miller and Hahn 2006). Enfin, il a été montré que XPB possède une activité translocase ATP-dépendante (Fishburn et al 2015). Finalement, XPB constituerait un frein à l'ouverture de l'ADN et donc à l'initiation de la transcription. Ce blocage serait levé grâce à l'utilisation d'ATP par XPB pour transloquer en aval du TSS et ainsi libérer le promoteur (Alekseev et al 2017). Ce modèle est aussi compatible avec un mécanisme commun entre les trois ARN polymérases I, II et III, où l'ouverture du promoteur est menée par l'assemblage du PIC et est régulée par différents facteurs spécifiques, tels que TFIIH dans le cas de la machinerie transcriptionnelle de l'ARN polymérase II.

La revue ci-après montre le nouveau modèle d'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur grâce à l'action de XPB, cassant le dogme de l'ouverture grâce à son activité hélicase. Cette revue est basée sur le travail accompli dans notre laboratoire et auquel j'ai participé (Alekseev et al 2017) (Voir partie 1 des résultats).

Unified promoter opening steps in eukaryotic gene expression

Jérémy Sandoz and Frédéric Coin

The interest of scientists for the transcription of the eukaryotic genome started four decades ago with the purification of the three RNA polymerase (Pol) enzymes. Pol I, II and III transcribe different species of RNA with the help of several general/basal transcription factors (TFs). Messenger RNA (mRNA) transcription by Pol II has been intensely studied owing first to the protein-coding function of mRNA and also to the apparent complexity of this system compared to the transcription of ribosomal RNAs by Pol I or small RNAs by Pol III. Indeed, it was shown very early that mRNA transcription required, apart from Pol II, additional enzymatic activities that didn't seem to be needed in the Pol I or III systems. Surprisingly enough, all these activities reside in TFIIF, a multi-subunit transcription/repair factor that is involved, through its CDK7 and XPB subunits, both in the phosphorylation of the carboxyl-terminal domain of the largest Pol II subunit and in the ATP-dependent opening of the promoter around the transcription start site, respectively [3]. Consequently, the model of promoter opening that has prevailed in class II gene expression during the last four decades suggests that XPB was an ATP-dependent DNA helicase that unwinds promoter DNA from -8 to +2, relative to the transcription start site (Figure 1, former model). Since transcription initiation takes place in the absence of ATP in Pol I- and III dependent transcription, it was expected that these enzymes used different molecular mechanisms to open their promoters, using the energy generated during the formation of their PIC.

Recent results contradicted the above Pol II model and have deeply modified our view of transcription initiation in eukaryotes. First of all, in contrast to its ATPase activity that is robust, the *in vitro* helicase activity of XPB appeared very low [3]. Rather, XPB showed the structural and biochemical characteristics of a translocase, able to move along the double stranded DNA without unwinding it [3].

Moreover, technical advances in our capacity to localize transcription factors inside the preinitiation complex (PIC) have revealed that XPB was binding to the promoter DNA downstream from the transcription start site, a location that was not compatible with its role in promoter opening [3]. In addition, recent structural studies revealed that the Pol I and III machineries contained a core that was structurally and functionally conserved in the Pol II initiation complex, pinpointing to a possible convergence of the three systems to a single

mechanism of transcription initiation [8]. The final blow to the canonical model of helicase-dependent mechanism of class II promoter opening came from the discovery that Pol II-dependent transcription was sensitive to the inhibition of XPB ATPase activity but accommodated to the absence of the protein [1]. These observations, seemingly contradictory, become meaningful when one takes into consideration the current knowledge about transcription initiation described above. Indeed, they all converge to a model in which XPB initially acts as an inhibitor of promoter opening, blocking the ATP-independent unwinding of the promoter generated by the formation of the PIC. In a second step, XPB uses ATP to translocate along the double stranded DNA downstream from the transcription start site. This movement liberates the promoter and allows its helicase-free Pol I/III-like opening (Figure 1). This model implies that Pol I, II and III do not differ mechanistically from each other on the way promoters are opened but rather on the presence of a regulatory step in Pol II-dependent transcription that controls in time and space promoter opening after the formation of the PIC.

The new regulatory step described above depends on the ATPase activity of XPB and is probably the target of the very promising anti-cancer compound Minnelide. This small molecule is a synthetic prodrug of Triptolide, a diterpenoid epoxide endogenously produced by the thunder god vine, *tripterygium wilfordii*, which binds XPB

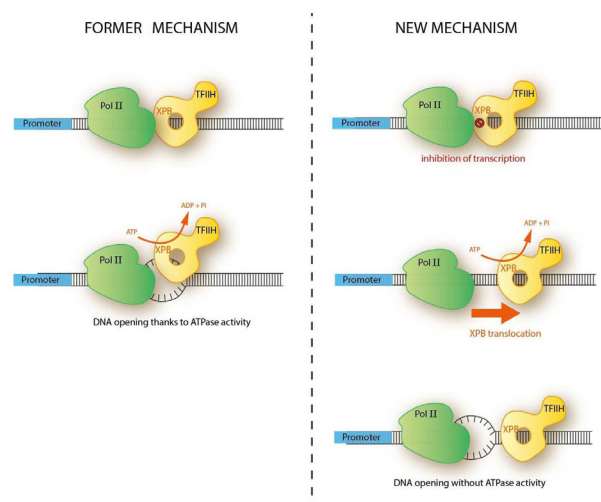


Figure 1: Former and new mechanisms of promoter opening in Pol II-dependent gene expression.

and inhibits its ATPase activity [7]. Minnelide is currently in Phase I clinical trials and shows activity against several gastrointestinal cancers [2]. Several proteins were reported to bind to Triptolide but only mutations in the Cys342 of XPB conferred to cancer cells their resistance to this drug [4], validating XPB as its main target *in vivo*. Through the inhibition of the ATPase activity of XPB, Triptolide and Minnelide probably inhibit the translocation of XPB downstream of the transcription start site thereby disrupting the release of the transcriptional block imposed by XPB itself. Similar observations concerning the involvement of XPB in basal transcription have been made in the last months [5, 6]. They confirmed that basal transcription can take place without XPB but some of these data also indicated that the absence of XPB impacts specific transcription programs. For instance, it was shown that expression of genes that were targeted by the viral protein “tat” depended on the presence of XPB [6]. It is not known why XPB would become needed when “tat” protein is involved but this model is of interest to the further understanding of the different functions of XPB in transcription initiation.

Frédéric Coin: IGBMC, Department of Functional Genomics and Cancer, CNRS/INSERM/University of Strasbourg, Illkirch, C.U. Strasbourg, France; Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, Illkirch, France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U964, Illkirch, France; Université de Strasbourg, Illkirch, France

Correspondence to: Frédéric Coin, **email** fredr@igbmc.fr

Keywords: TFIIH, XPB, transcription, promoter opening

Received: September 15, 2017

Published: September 29, 2017

REFERENCES

1. Alekseev S, et al. Mol Cell. 2017; 65:504-514 e504.
2. Chugh R, et al. Sci Transl Med. 2012; 4:156ra139.
3. Compe E and Egly JM, et al. Annu Rev Biochem. 2016; 85:265-290.
4. He QL, et al. Angew Chem Int Ed Engl. 2015; 54:1859-1863.
5. Kemp MG, et al. J Biol Chem. 2017; 292:12424-12435.
6. Lacombe B, et al. J Virol. 2016; 90:10972-10980.
7. Smurnyy Y, et al. Nature chemical biology. 2014; 10:623-625.
8. Vannini A, et al. Mol Cell. 2012; 45:439-446.

Copyright: Sandoz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

4.2.2. Dans la réparation par excision de nucléotides

La protéine XPB a aussi un rôle essentiel dans la réparation par excision de nucléotides. L'activité hélicase de 3' vers 5' de XPB a longtemps été considérée comme responsable, avec l'activité hélicase de 5' vers 3' de XPD, de l'ouverture de l'ADN au niveau de la lésion (Ma et al 1994b ; Schaeffer et al 1993, 1994 ; Sung et al 1993). En réalité, l'activité hélicase de XPB est dispensable à l'ouverture de l'ADN et seule l'activité ATPase est essentielle (Oksenyich et al 2009). En effet, il a été démontré que les motifs RED et ThM de XPB, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, permettent l'ancrage de XPB et donc de TFIIH à l'ADN. Le motif ThM se lie à l'ADN de façon indépendante de la séquence. Puis, l'hydrolyse de l'ATP permet un changement de la conformation de XPB, amenant le motif RED à proximité du ThM et permettant ainsi l'ancrage à l'ADN et l'action ultérieure de XPD (Figure 20) (Coin et al 2007).

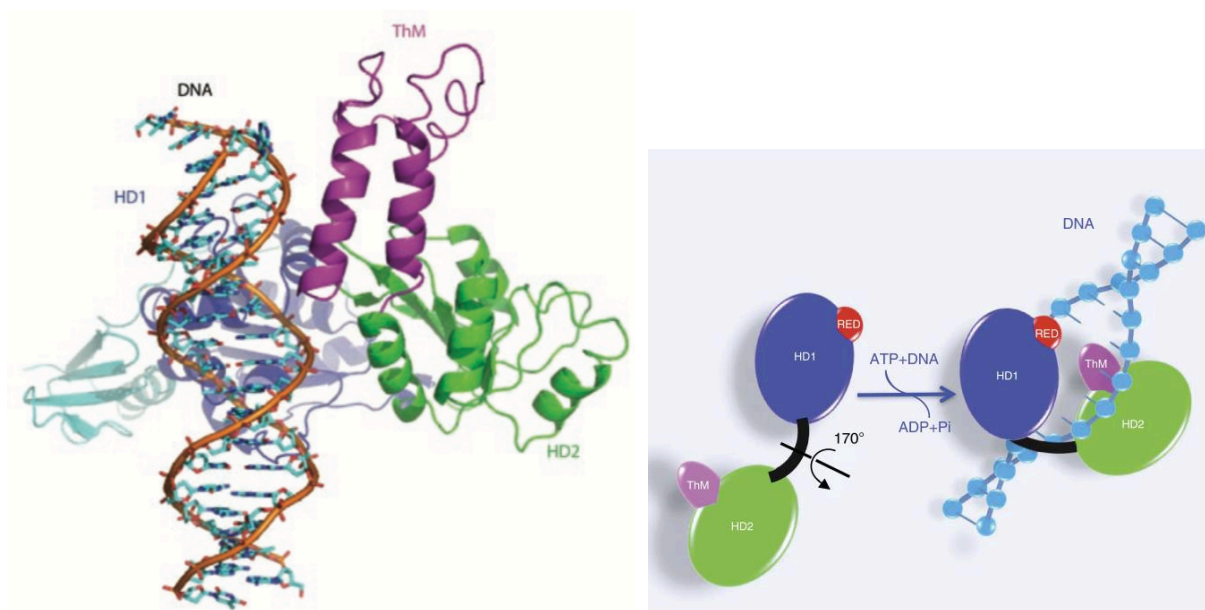


Figure 20 : Structure cristallographique de XPB (gauche) et schéma du changement de conformation grâce à l'utilisation de son activité ATPase (droite). Adaptées de Oksenyich and Coin 2010 (gauche) et Oksenyich et al 2009 (droite)

Cette activité ATPase est régulée par XPC aussi bien que par les sous-unités p52 et p8 de TFIIH comme expliqué précédemment. La contribution importante de p52 a été révélée par l'étude du gène *mrn* (marionette) qui code pour p52 chez *Drosophila melanogaster*, où une

mutation déstabilisant l'interaction de XPB avec p52 avait pour effet de réduire l'activité ATPase de XPB (Fregoso M et al 2007).

4.3. Mutations dans XPB

Des mutations dans *ERCC3* codant pour XPB ont très rarement été retrouvées chez les patients. Pendant longtemps, cela a été expliqué par le rôle essentiel de cette sous-unité dans le complexe TFIIH, or les récentes informations obtenues sur XPB pourraient remettre en cause cette explication (Voir partie conclusion). Seulement douze cas (de huit familles différentes) ont été rapportés jusqu'à maintenant (Ferri D et al 2019). Les mutations qui nous intéressent ici sont les deux substitutions d'acides aminés présentes dans l'extrémité N-terminale de XPB : les mutations F99S et T119P.

4.3.1. La mutation F99S

La mutation F99S a été rapportée par Scott et al en 1993. Elle a été détectée chez un frère jumeau ayant un phénotype XP/CS, montrant des problèmes neurologiques CS mais pas de problèmes neurologiques XP. A l'âge de 6 semaines, il développait des coups de soleil sévères. Il a commencé à marcher à l'âge de 1 an et dire ses premiers mots à l'âge de 2 ans. Il a développé des difficultés d'audition à 4 ans. Sa peau était sèche avec de nombreuses macules hyper pigmentées comme des taches de rousseur, notamment dans les zones exposées au soleil, avec cependant l'absence de cancer. Avec l'âge, le patient a développé plusieurs anomalies neurologiques comme une hydrocéphalie avec une atrophie prononcée du cervelet et un élargissement du quatrième ventricule ou encore une neuropathie démyélinisante. Il a aussi développé plusieurs anomalies sexuelles.

Au niveau moléculaire, cette mutation porte atteinte à l'interaction de XPB avec p52, empêchant la stimulation de l'activité ATPase de XPB par p52 et TTDA et expliquant le défaut de mécanisme NER chez ces patients XP-B/CS^{F99S} (Coin et al 2007).

4.3.2. La mutation T119P

La mutation T119P a été rapportée par Weeda et al en 1997. Le patient était un homme avec un phénotype TTD. Il a été examiné à la naissance avec une ichtyose congénitale (bébé collodion). Les conditions de la peau se sont améliorées dans les 3 semaines après, laissant qu'une légère ichtyose partielle. La TTD a été suspectée à l'âge de 3 ans, sur la base de cette légère ichtyose présente sur le cuir chevelu, la paume des mains et la plante des pieds, une légère photosensibilité, l'absence de la seconde incisive supérieure et la croissance des cheveux qui se faisait normalement mais avec un motif de « queue de tigre » sous lumière polarisée. Le diagnostic a été confirmé plus tard par analyse biochimique et analyse au microscope des cheveux montrant un contenu faible en cystéine. Le défaut de mécanisme NER chez ces patients TTD^{T119P} est plus modéré que pour la mutation F99S, où seule la réparation des CPD, et non des 6-4PP, est affectée (Riou et al 1999). Ce défaut serait induit par la déstabilisation du complexe TFIIH due à la présence de la mutation T119P dans XPB (Botta et al 2002).

5. Questions posées au cours de la thèse

Comme montré précédemment, les problématiques abordées au cours de ma thèse ont porté sur l'étude de la sous-unité XPB du complexe TFIIH. L'étude de cette sous-unité est particulièrement intéressante car elle forme un parfait exemple de protéine dont la structure ne reflète pas forcément sa fonction. En effet, elle est formée de domaines hélicase et classée dans la superfamille SF2 des hélicases et pourtant ne semble pas utiliser cette activité dans ses fonctions. De plus XPB se démarque encore de cette superfamille par sa longue extrémité N-terminale.

Afin d'éclaircir un peu plus ces derniers points, les stratégies présentées en début d'introduction c'est-à-dire l'utilisation de drogues agissant sur TFIIH et l'étude de mutations dans le complexe ont été adoptées dans deux projets.

Premièrement, de plus en plus d'études remettaient en question l'action de XPB via son activité hélicase dans l'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur durant l'initiation de la

transcription. Ainsi dans la première étude, nous avons utilisé différentes drogues, présentées dans la partie 2.4, agissant sur TFIID et notamment XPB, afin d'observer leur effet sur la transcription. De façon surprenante, les résultats ont montré que la synthèse des ARNm est très sensible à l'inhibition de l'activité ATPase de XPB mais paradoxalement s'accommode à la suppression de la protéine entière. Nous avons ainsi réussi à démontrer que les observations réalisées précédemment dans d'autres études étaient indéniables et que XPB jouerait plutôt un nouveau point de régulation de l'initiation de la transcription.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un papier publié dans la revue scientifique *Molecular Cell* en 2017 et présenté dans la partie résultats de ce manuscrit (partie 1). Dans ce papier j'ai principalement réalisé des expériences de microscopie dans le but d'analyser la transcription à l'aide d'un gène rapporteur en présence ou non de drogues agissant sur XPB.

Dans un second projet, je me suis donc intéressé à l'extrémité N-terminale de XPB. Le seul rôle connu de cette extrémité se résumait seulement à l'interaction de XPB avec p52. Cette interaction est très importante pour l'activité de XPB car p52 est capable de stimuler l'activité ATPase de XPB. Néanmoins réduire le rôle du NTD à cette seule interaction n'est pas justifié étant donné la longueur et la structure organisée de ce domaine. Nous avons donc utilisé la stratégie consistant à analyser les effets de mutations présentes dans le NTD et retrouvées chez des patients afin d'en déduire le rôle physiologique de cette extrémité.

Les travaux se sont basés sur une expérience consistant à immobiliser sur la chromatine XPB sauvage, muté dans le NTD ou ne contenant plus son NTD grâce au système lacO/lacR qui nous a permis de visualiser un rôle du NTD dans le remodelage de la chromatine.

Les résultats de cette étude ont mené à la publication d'un papier dans la revue scientifique *Nature Communications* en 2019, présenté dans la partie résultats de ce manuscrit (partie 2). Dans ces travaux j'ai effectué la majeure partie des expériences.

Résultats

Première partie

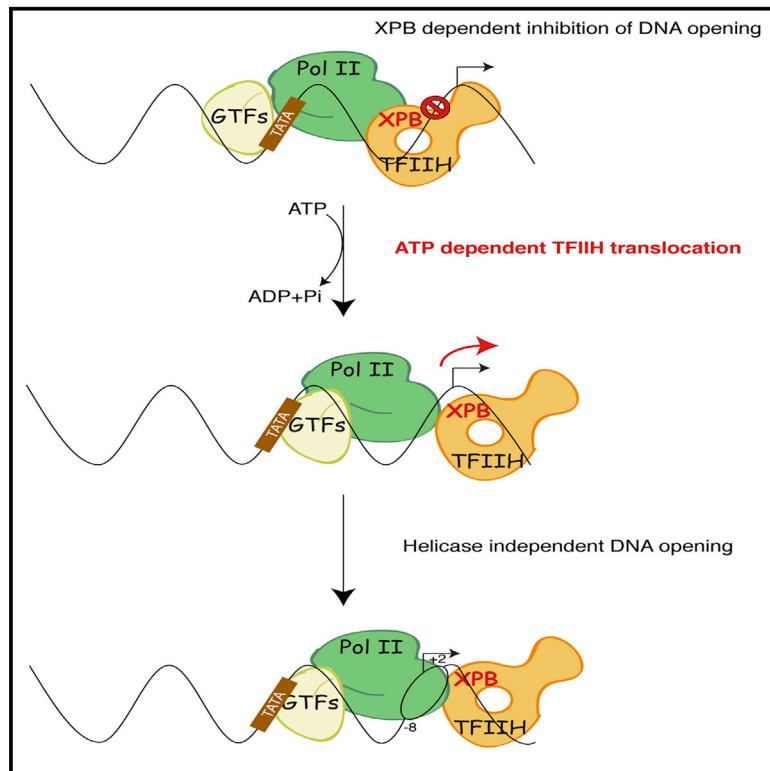
Transcription without XPB establishes a unified helicase-independent mechanism of promoter opening in eukaryotic gene expression

Sergey Alekseev, Zita Nagy, Jérémy Sandoz, Amélie Weiss, Jean-Marc Egly, Nicolas Le May and Frédéric Coin

Département de génomique fonctionnelle et Cancer, CNRS, INSERM,
Université de Strasbourg, Institut de Génétique et de Biologie
Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch-
Graffenstaden, France

Transcription without XPB Establishes a Unified Helicase-Independent Mechanism of Promoter Opening in Eukaryotic Gene Expression

Graphical Abstract



Authors

Sergey Alekseev, Zita Nagy, Jérémy Sandoz, Amélie Weiss, Jean-Marc Egly, Nicolas Le May, Frederic Coin

Correspondence

fredr@igbmc.fr

In Brief

The depletion of the TFIID XPB subunit *in vivo* leaves transcription intact. In marked contrast, inhibition of XPB ATPase activity affects transcription, revealing that mRNA expression paradoxically accommodates the absence of XPB while being sensitive to the inhibition of its ATPase activity. We show that the XPB ATPase activity is only used to relieve a transcription initiation block imposed by XPB itself. Our results suggest that no helicase is needed for mRNA transcription, thereby unifying the mechanism of promoter DNA opening for the three eukaryotic RNA polymerases.

Highlights

- mRNA synthesis is sensitive to the inhibition of the ATPase activity of XPB
- mRNA synthesis accommodates the depletion of XPB
- XPB-depleted TFIID participates in mRNA synthesis
- XPB ATPase overcomes transcription initiation block imposed by its helicase motifs



Transcription without XPB Establishes a Unified Helicase-Independent Mechanism of Promoter Opening in Eukaryotic Gene Expression

Sergey Alekseev,^{1,2,3,4,5} Zita Nagy,^{1,2,3,4,5} Jérémy Sandoz,^{1,2,3,4} Amélie Weiss,^{1,2,3,4} Jean-Marc Egly,^{1,2,3,4} Nicolas Le May,^{1,2,3,4} and Frederic Coin^{1,2,3,4,6,*}

¹IGBMC, Department of Functional Genomics and Cancer, Equipe Labellisée Ligue 2014, CNRS/INSERM/University of Strasbourg, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, C.U. Strasbourg, France

²Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, 67404 Illkirch, France

³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U964, 67404 Illkirch, France

⁴Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France

⁵Co-first author

⁶Lead Contact

*Correspondence: fredr@igbmc.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.012>

SUMMARY

Transcription starts with the assembly of pre-initiation complexes on promoters followed by their opening. Current models suggest that class II gene transcription requires ATP and the TFIID XPB subunit to open a promoter. Here, we observe that XPB depletion surprisingly leaves transcription virtually intact. In contrast, inhibition of XPB ATPase activity affects transcription, revealing that mRNA expression paradoxically accommodates the absence of XPB while being sensitive to the inhibition of its ATPase activity. The XPB-depleted TFIID complex is recruited to active promoters and contributes to transcription. We finally demonstrate that the XPB ATPase activity is only used to relieve a transcription initiation block imposed by XPB itself. In the absence of this block, transcription initiation can take place without XPB ATPase activity. These results suggest that a helicase is dispensable for mRNA transcription, thereby unifying the mechanism of promoter DNA opening for the three eukaryotic RNA polymerases.

INTRODUCTION

The transcription of the eukaryotic genome depends on three multisubunit RNA polymerases (Pol), Pol I, II, and III, associated with the general transcription factors (TFs) to form the pre-initiation complexes (PICs). All eukaryotic PICs share a conserved core complex responsible for stable open-complex formation (Vannini and Cramer, 2012). This core complex is composed of a Pol, the TATA binding protein (TBP), and the basal TFs TFIIB and TFIIE or proteins structurally or functionally related to these factors or some of their specific domains. Despite these similarities, the eukaryotic Pol II-containing PIC differs from the other

PICs since it additionally requires the presence of the general TF TFIID and ATP to open class II promoter DNA (Kandiah et al., 2014). Pol I, and Pol III machineries, like the archaeal polymerase, use ATP-independent molecular mechanisms to open promoters, exploiting the binding energy generated upon the creation of the PIC (Feklistov and Darst, 2011).

TFIID can be resolved into two sub-complexes that are bridged by the XPD helicase subunit: the core (composed of the XPB and the subunits p62, p52, p44, p34, and TTD) and the CAK (composed of MAT1, cyclin H, and the CDK7 kinase) (Compe and Egly, 2016; Zurita and Merino, 2003). Apart from class II gene expression, TFIID also plays an essential post-initiation role in Pol I transcription, which is not yet very well understood (Zurita and Merino, 2003).

For many years, the function of TFIID in class II gene transcription initiation was accepted to be dual; XPB hydrolyzes ATP to open the DNA around the transcription start site while the CDK7 kinase phosphorylates the C-terminal domain (CTD) of the largest Pol II subunit on the serine 5 (Holstege et al., 1996; Ohkuma and Roeder, 1994). However, this mechanistic view of the role of TFIID during transcription initiation has been contradicted by several observations suggesting that the XPB helicase activity was not essential to transcribe mRNA. First, it was observed that the transcription of a negatively supercoiled DNA template could take place independently from XPB activities in vitro (Timmers, 1994). Later, it was shown that the helicase activity of XPB in holo TFIID is negligible compared to true helicases such as XPD (Coin et al., 1998). Subsequently, it was demonstrated that XPB binds downstream of the melting region (Kim et al., 2000; Miller and Hahn, 2006) and, more importantly, that the helicase activity of yeast XPB is dispensable for promoter opening on a linear DNA template in vitro that is instead driven by the ATPase activity of XPB alone (Lin et al., 2005). Finally, recent advances in cryoelectron microscopy structures of yeast initiation complex suggested that DNA opening could take place in the absence of TFIID (Plaschka et al., 2016). It is accepted today that XPB is not a conventional helicase that would open double-stranded DNA (dsDNA) by breaking its base pairings along with ATP hydrolysis. XPB would function more like a molecular

wrench to melt the promoter of the transcribed gene by rotating the dsDNA downstream relative to the initiation site (Fan and DuPrez, 2015). In addition, dsDNA translocase activity has been unveiled in XPB that would allow it to pump DNA into the active site cleft of Pol II (Grünberg et al., 2012; Murakami et al., 2013). However, our understanding of the role of XPB and its enzymatic activities in transcription initiation remains elusive.

Beyond Pol I and II transcription, TFIIH participates in nucleotide excision repair (NER) (Drapkin et al., 1994; Feaver et al., 1993; Schaeffer et al., 1993) that contributes to removing DNA lesions generated by bulky adducts. After lesion recognition by XPC, the ATPase activity of XPB recruits the holo TFIIH to damaged DNA and the helicase activity of XPD opens the DNA around the lesion (Oksenyich et al., 2009). Subsequently, the downstream NER factors XPA, XPG, and ERCC1-XPF trigger excision of the damaged oligonucleotide (Riedl et al., 2003; Volker et al., 2001).

In this study, we revisited the role of XPB in transcription and repair using a new approach to quickly deplete it from cells without destabilizing the rest of the complex. With this tool in hand, we demonstrated that depletion of XPB strongly inhibits DNA repair but hardly affects class II gene expression. Paradoxically, inhibition of the ATPase activity of XPB by the small molecule triptolide (TPL) strongly inhibits transcription, revealing that Pol II transcription accommodates the absence of XPB, but not to the inhibition of its ATPase activity. In XPB-depleted cells, gene expression becomes resistant to TPL but remains fully sensitive to THZ1, a CDK7 kinase-specific inhibitor. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) or immunodepletion of TFIIH from cell extracts extended this observation and demonstrated that an XPB-depleted TFIIH complex is recruited to active promoters and contributes to gene expression. Finally, we unveiled that XPB ATPase activity is only used to relieve a transcription initiation block imposed by XPB itself. By introducing mutations in the RecA domains of XPB, we generated a TFIIH complex that can initiate transcription in the presence of TPL. These findings provide a model for how XPB functions in transcription and imply that a helicase-independent mechanism of promoter DNA opening is operating in all three RNA Pol-dependent transcription systems in eukaryotes.

RESULTS

Transcription Synthesis Is Sensitive to Inhibition of XPB ATPase Activity but Accommodates the Depletion of the Enzyme

We addressed the contribution of XPB and CDK7 to global transcription synthesis by treating cells with either TPL, a specific inhibitor of the ATPase activity of XPB (Titov et al., 2011), or THZ1, a specific inhibitor of the kinase activity of CDK7 (Kwiatkowski et al., 2014). We first set up the conditions to quantify RNA synthesis *in vivo* using 5-ethynyl uridine (5EU) labeling (Figure S1A, available online) and determined that both drugs impaired global transcription (Figure 1A, compare panels a and b with panels c and d and e and f; Figure 1B, compare lane 1 with lanes 2 and 3). We further studied the transcriptional impact of TPL and THZ1 in cells depleted of XPB after pre-treatment with Spironolactone (SP), a drug inducing the potent and fast degradation of XPB (Alekseev et al., 2014) (see Discussion).

We titrated the residual amount of XPB in MRC5 cells treated with SP for 4 hr and determined that it corresponds to less than 5% of the amount of XPB present in DMSO-treated cells (Figure S1B). Remarkably, global transcription was almost unaffected by TPL when cells were depleted of XPB (Figure 1A, compare panels c and d with g and h; Figure 1B, compare lanes 2 and 4), while inhibition by THZ1 was still robust in these conditions (Figure 1A, compare panels e and f with i and j; Figure 1B, compare lanes 3 and 5). In agreement with these observations, SP treatment alone did not affect global transcription (Figures 2Aa–2Ad and 2B) despite the potent depletion of XPB (Figures 2Ac and 2C). In parallel, we pre-treated cells with low concentration of actinomycin D, which blocked Pol I-dependent transcription and abolished the intense nucleolar 5EU staining (Figure S1C) (Jao and Salic, 2008). In these conditions, the remaining nucleoplasmic 5EU signal, which mainly corresponds to Pol II activity (Jao and Salic, 2008; Figure S1C), appeared more homogeneous and resisted the depletion of XPB (Figures 2Ae–2Ah and 2B). Altogether, these data indicate that mRNA synthesis is highly sensitive to the inhibition of the ATPase activity of XPB but paradoxically accommodates its depletion.

Depletion of XPB Affects DNA Repair

To assay whether TPL, THZ1, and SP affected DNA repair, we measured the nuclear level of the main UV-induced DNA lesions, (6-4)PP, which are removed shortly after UV irradiation by NER, and observed a potent inhibition of DNA repair following treatment with either SP or TPL, while treatment with THZ1 did not affect it (Figure 3A). Consequently, SP-treated cells showed a higher sensitivity to UV-C irradiation compared to the DMSO control (Figure 3B). We also generated whole-cell extracts (WCEs) from either DMSO- or SP-treated cells and confirmed that depletion of XPB affected NER in a dual incision assay *in vitro* (Figure 3C).

Local UV irradiation *in vivo* (Volker et al., 2001) subsequently showed that the p62 subunit of TFIIH and the downstream NER factor XPA co-localized with the damage recognition factor XPC in discrete spots corresponding to irradiated areas of cell nuclei in DMSO-treated cells (Figures 3D, 3Ea, and 3Eb). Following depletion of XPB by SP, XPC still accumulated efficiently on UV-irradiated spots while p62 and XPA failed to do so (Figures 3D, 3Ec, and 3Ed), indicating that NER deficiency in SP-treated cells originates from an impaired recruitment of TFIIH and downstream factors to damaged DNA due to depletion of XPB.

Depletion of XPB Does Not Affect Pol II-Dependent Gene Expression

The above data suggest a differential involvement of XPB in transcription and DNA repair. To further study the consequences of the depletion of XPB in Pol II-dependent transcription, we used the human osteosarcoma U2OS cell line containing a Tet-controlled transcription/translation reporter (CFP-SKL) (Shanbhag et al., 2010). With this well-defined Pol II-dependent reporter system, nascent transcript visualization and protein accumulation of CFP-SKL can be observed upon doxycycline (Dox) treatment (Figure 4A). CFP-SKL expression and protein accumulation were both inhibited by TPL and THZ1 but barely affected by TPL when cells were pre-treated with SP (Figure 4B, lanes 4–7; Figure 4C, lanes 3–6). Coherently,

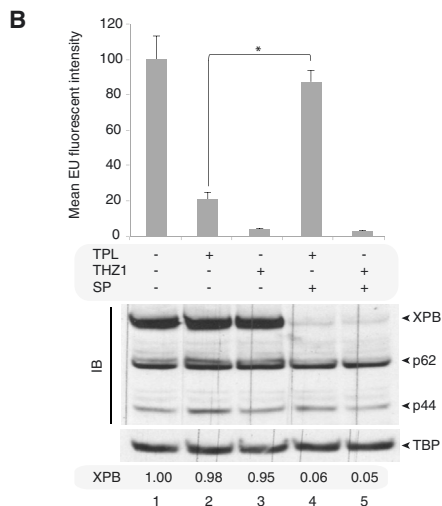
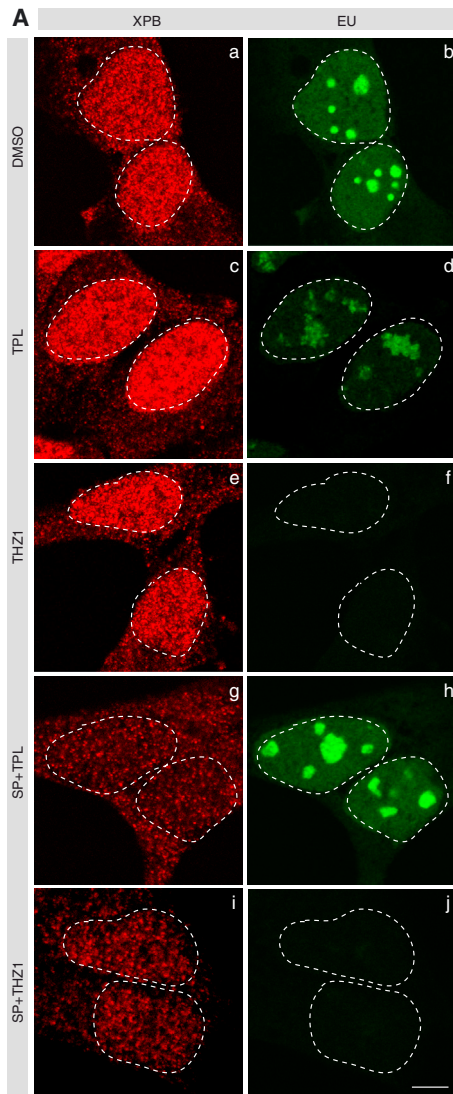


Figure 1. Inhibition of CDK7 Kinase and XPB ATPase Affects Global Transcription

(A) MRC5 fibroblasts were treated either with DMSO (a and b), TPL (c and d), or THZ1 (e and f) for 4 hr. Alternatively, cells were pre-treated with SP alone for 4 hr before addition of either TPL+SP (g and h) or THZ1+SP (i and j) for 4 hr. Transcribed RNAs were labeled by 5EU incorporation and cells were immunostained with anti-XPB antibody, followed by fluorescent confocal microscopy. Scale bar, 10 μ m.

(B) MRC5 fibroblasts were treated as in (A) and either RNAs were labeled by 5EU incorporation or cells were lysed and cell extracts resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-XPB, anti-p62, anti-p44, or anti-TBP antibodies. * $p < 0.05$. XPB was quantified and normalized with TBP.

potent depletion of XPB alone had only a minor impact on *CFP-SKL* mRNA expression and protein accumulation (Figure 4B, lane 3; Figure 4C, lane 2). We also visualized the accumulation of the total Pol II or the initiating Pol II, phosphorylated on serine 5 of the CTD by CDK7 (Pol II Ser5P), to the CFP-SKL loci. We observed both forms accumulating in the absence of XPB, but not following TPL treatment (Figures 4D–4F). Altogether, these data confirm that class II gene expression is functional without XPB.

Depletion of XPB Does Not Affect New Transcription Synthesis

We further analyzed the re-start of RNA transcript synthesis in XPB-depleted cells. For that purpose, we pre-treated cells with 100 μ M 5,6-dichloro-1- β -D-ribozimidazole (DRB), a concentration expected to inhibit initiation and early elongation while permitting mature elongation complexes to complete transcription (Singh and Padgett, 2009). Consequently, treatment with DRB inhibited 5EU incorporation into RNA (Figure 5A, compare panels a and b with c and d; Figure 5B, compare lanes 1 and 2), but its removal permitted re-start of transcription visualized by the recovery of 5EU incorporation (Figures 5Ae, 5Af, and 5B, lane 3). Remarkably, transcription re-start was not significantly affected by the depletion of XPB (Figures 5Ag–5Aj and 5B, lanes 4–5) but did not take place following inhibition of the XPB ATPase activity by TPL (Figure 5C).

We further used an *in vitro* Pol II-dependent run-off assay measuring the *de novo* transcription of the viral adenovirus major late promoter (AdMLP) reporter (Gerard et al., 1991). In this assay, WCE(SP) showed slightly lower, but significant, transcription activity compared to WCE(DMSO) (Figure 5D, Tx, compare lanes 2 and 3 with 5 and 6), although XPB was hardly detectable in this extract (Figure 5D, IB, compare lanes 2 and 3 with 5 and 6). We also conducted TFIIH immunodepletion experiments on both WCE(DMSO) and WCE(SP) to generate WCE(DMSO Δ TFIIH) and WCE(SP Δ TFIIH). Both extracts displayed reduced transcription activity compared to their respective controls (Figure 5D, compare lane 3 with 4 and lane 6 with 7). Furthermore, the XPB-depleted TFIIH complex immunoprecipitated from WCE(SP) (TFIIH(SP)) harbored equal composition of XPD, p62, p52, p34, and CDK7 subunits (Figure 5E, left panel) and a lower, but significant, transcription activity, compared to TFIIH(DMSO) (Figure 5E, right panel). Altogether, these data suggest that the XPB-depleted TFIIH complex can exist and contribute to Pol II-dependent transcription initiation.

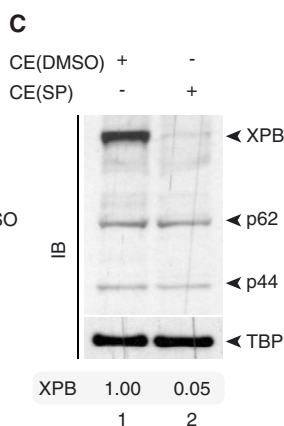
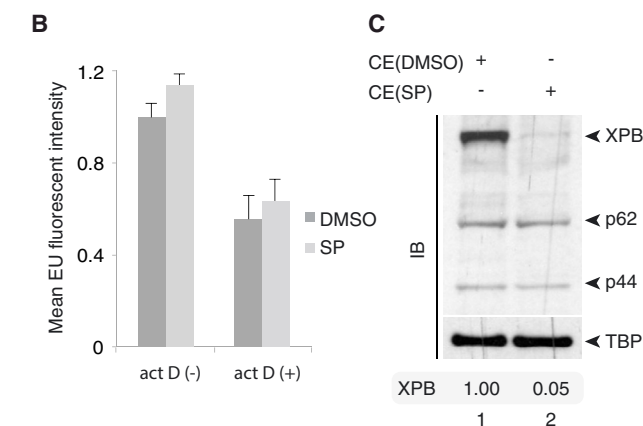
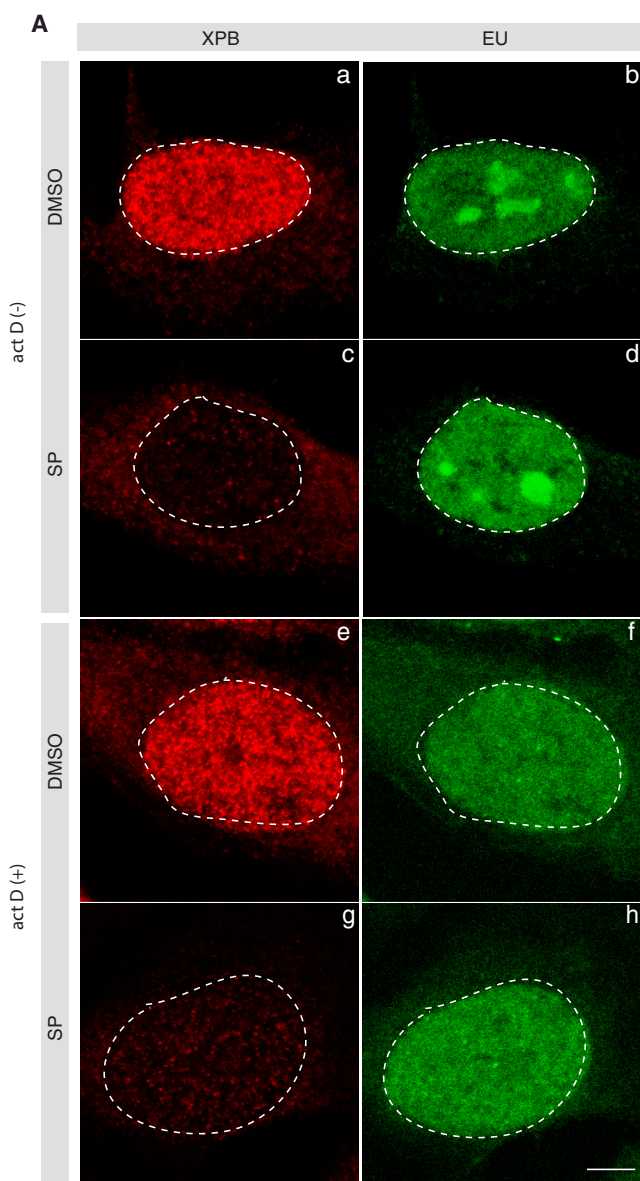


Figure 2. Depletion of XPB Does Not Affect Global Transcription

(A) MRC5 fibroblasts were incubated either with DMSO (a, b, e, and f) or SP (c, d, g, and h) for 4 hr. When indicated (e–h), cells were pre-treated with a low concentration of actinomycin D (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 hr. Transcribed RNAs were labeled by 5EU incorporation and cells were immunostained with anti-XPB antibody, followed by fluorescent confocal microscopy. Scale bar, 5 μm . (B) MRC5 fibroblasts were treated as described in (A) and RNAs were labeled by 5EU incorporation.

(C) MRC5 fibroblasts were treated either with DMSO or SP for 4 hr and cells were lysed, resolved by SDS-PAGE, and immunoblotted with anti-XPB, anti-p62, anti-p44, or anti-TBP antibodies. XPB was quantified and normalized with TBP.

Depletion of XPB Does Not Impair RA-Dependent Gene Transactivation

Having shown that XPB depletion didn't dramatically affect basal transcription, we subsequently analyzed whether it may affect the transactivation of genes under the control of trans-retinoic acid (RA). We first observed that potent depletion of XPB (Figure 6A) barely affected the transactivation of the representative RA-dependent genes *CDH5*, *RAR β 2*, or *SMAD3* over time of RA treatment (Le May et al., 2012), while inhibition of the ATPase activity of XPB by TPL strongly impaired it (Figures 6B, S2A, and S2B). We further analyzed the transcriptome of RA-treated cells at the transactivation peak, 6 hr after addition of RA. In agreement with the above data, global RNA sequencing showed that depletion of XPB didn't affect gene transactivation while inhibition of its ATPase activity did (Figures 6C and S2C; Table S1).

We subsequently used ChIP assay to monitor the presence of TFs to the *CDH5* promoter in MRC5 cells at the transactivation peak. As expected, we observed an impaired recruitment of XPB to the *CDH5* promoter in SP-treated cells 6 hr after RA treatment, compared to the enrichment observed in cells treated with DMSO (Figure 6D). In the same conditions, the p62 subunit of TFIIH, Pol II, and Pol II Ser5p was efficiently enriched to the *CDH5* promoter (Figure 6D). Altogether, these data suggest that a TFIIH complex depleted of XPB can accumulate on active promoters to transactivate genes.

Mutation in the XPB RecA Domains Relieves Transcription Initiation Block Imposed by TPL

The above data suggested that the XPB ATPase activity is used to relieve an inhibition of transcription initiation imposed by XPB itself. In 2005, Gralla and collaborators proposed that the RecA domains of the yeast XPB homolog were inducing a block of transcription initiation (Lin et al., 2005). To analyze whether this model could explain our observation, we purified a human recombinant TFIIH complex (rIIH) from baculovirus-infected insect cells containing the five subunits of the core TFIIH (XPD, p62, p52, p44, and p34) together with XPB(WT) and XPB(K346R) (deficient in the ATPase activity of XPB) (Coin et al., 2007) or XPB(T469A) and XPB(Q638A), mutated in the helicase motifs III and VI (Lin et al., 2005; Coin et al., 2007) (Figures 7A and 7B). To evaluate the capacity of these complexes to trigger transcription initiation, we used an abortive initiation assay in which the first phosphodiester bond formation of a reporter priming dinucleotide RNA (CpA) hybridized to the transcription start site of

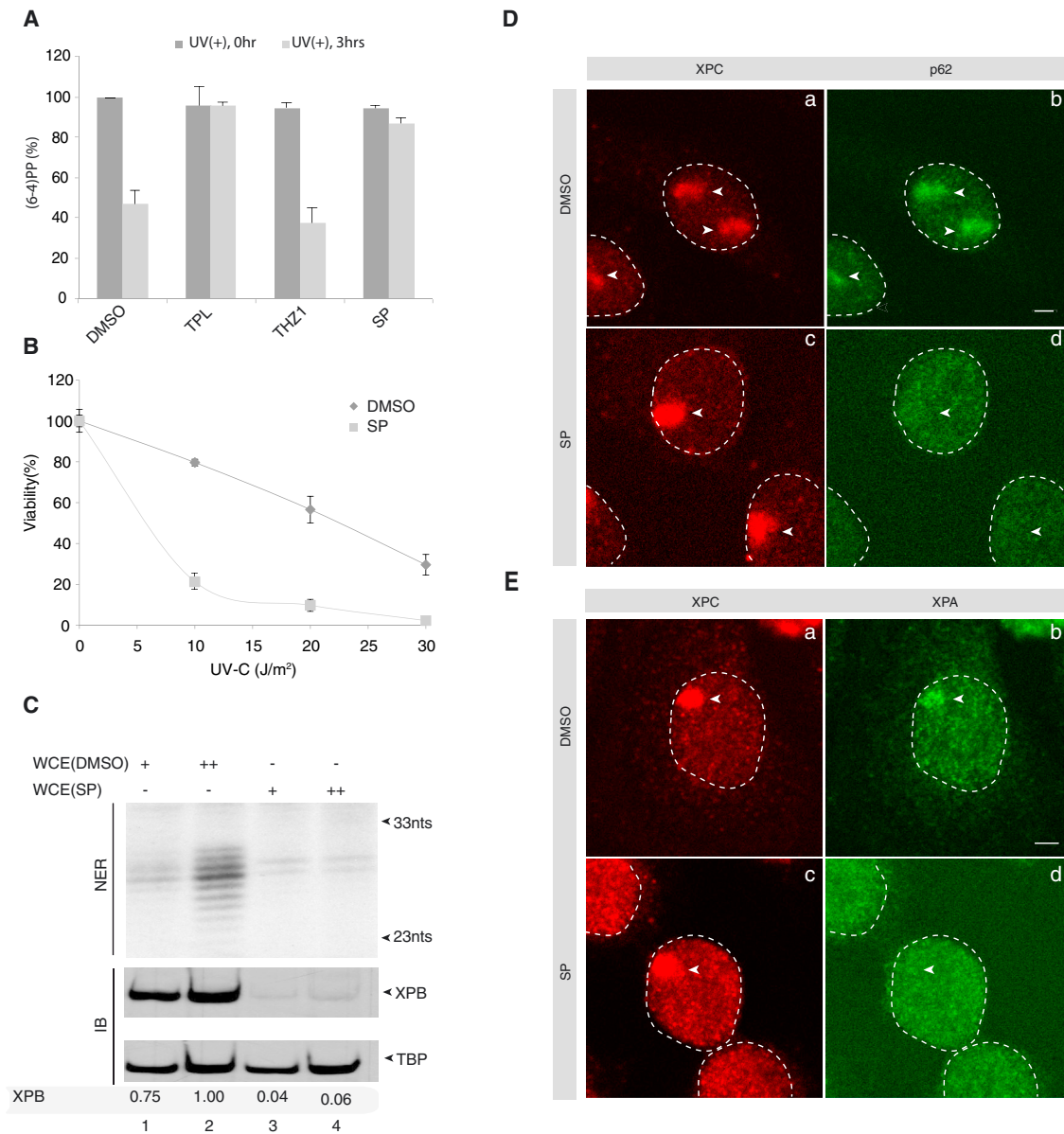


Figure 3. Depletion of XPB Affects NER and Recruitment of TFIIH to Damaged DNA In Vivo

(A) MRC5 fibroblasts were pre-treated with either DMSO, SP, TPL, or THZ1 for 4 hr before UV-C irradiation (60 J/m²), subsequently incubated for 3 hr, and fixed. (6-4)PP lesions were immunostained using anti-(6-4)PP antibodies and quantified (Oksenych et al., 2013).

(B) MRC5 fibroblasts were treated with increasing doses of UV-C in the presence of DMSO or SP and cell survival was determined 96 hr later. Data were normalized to the mock treatment controls (as value of 100). The values are the means of four independent experiments (±SD).

(C) A total of 50 or 100 μg WCE(DMSO) or WCE(SP), respectively, was tested in a dual incision assay (NER) in vitro (Riedl et al., 2003). CTL (control), WCE from HeLa cells. Sizes of the incision products are indicated. Alternatively, WCEs were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-XPB and anti-TBP antibodies (immunoblotting, IB). XPB was quantified and normalized with TBP.

(D and E) Following incubation with DMSO or SP for 4 hr, MRC5 cells were locally UV irradiated (100 J/m²) through 5 μm millipore filters, fixed 15 min later, and immunostained with anti-XPC (a-c) and anti-p62 (TFIIH) (b-d) antibodies (D) or anti-XPC (a-c) and anti-XPA (b-d) antibodies (E). Scale bar, 5 μm.

the AdMLP is measured in vitro (Goodrich and Tjian, 1994). Transcription initiation from the AdMLP in the presence of all the basal TFs, including rIIH/XPB(WT), generated radioactive trinucleotide (CpApC) that was impaired when rIIH/XPB(K346R) was used instead (Figure 7C, compare lanes 1 and 3). Remarkably, rIIH/XPB(T469A) and (Q638A) allowed synthesis of the

CpApC (Figure 7C, lanes 5 and 7). In agreement with the effect of TPL on gene expression in vivo, this drug strongly inhibited CpApC synthesis driven by rIIH/XPB(WT) (Figure 7C, lane 2) but strikingly had no impact on the synthesis driven by rIIH/XPB (T469A) or (Q638A) (Figure 7C, lanes 6 and 8). These data indicate that transcription initiation can take place in the absence

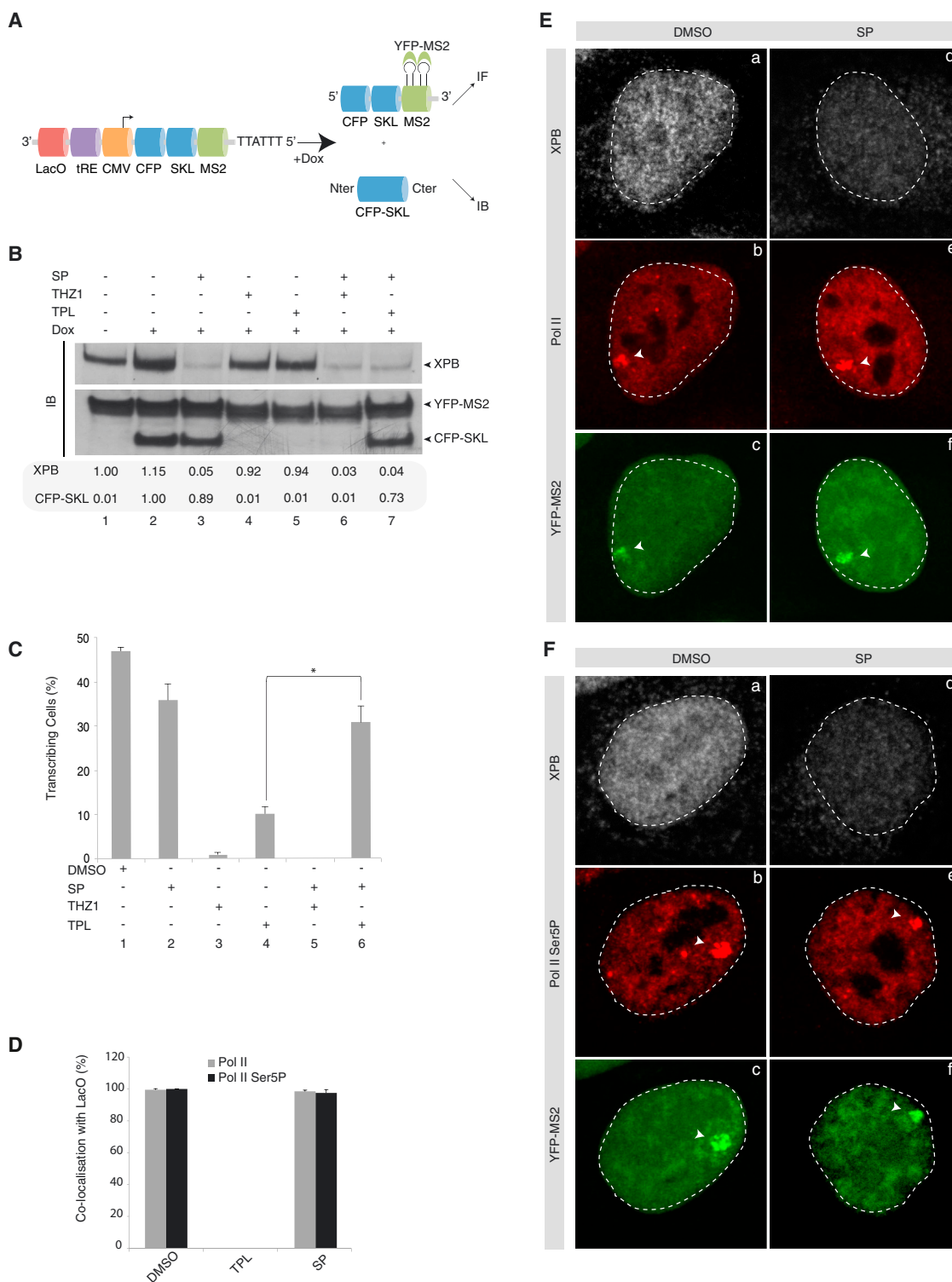


Figure 4. Transcription without XPB Analyzed at a Single Gene Locus

(A) Schematic representation of the reporter locus under the control of the Tet system integrated in U2OS cells. Lac operator (LacO) repeats (256 \times) and a tetracycline response element (tRE) array were inserted upstream of the CMV promoter controlling an inducible reporter gene coding for the CFP-SKL protein and containing 24 repeats of the MS2 RNA stem loop sequence. Following addition of dox, nascent transcript can be visualized by observing the binding of the YFP-MS2 protein (stably expressed in the cell line) to the MS2 stem loops of the mRNA (IF, immunofluorescence), while CFP-SKL protein can be detected by immunoblotting (IB).

(legend continued on next page)

of XPB ATPase activity when mutations in the RecA domains of XPB are introduced.

DISCUSSION

A Powerful Chemical Biology Approach to Measure the Impact of XPB in Transcription and Repair

The fact that XPB is part of TFIIH, a large protein complex with well-defined functions in protein-coding gene expression and NER, implies a higher level of complexity for studying its role *in vivo*. We needed to use a method that would target XPB but would leave intact the rest of the complex. For that, we used SP, which shows several technical advantages compared to the RNAi and CRISPR/Cas9 strategies or to the reconstitution of TFIIH complex *in vitro* (Tirode *et al.*, 1999). The SP-induced degradation of XPB protein is very efficient and rapid, with less than 5% of XPB protein retained after 1 hr of treatment. More importantly, the very quick degradation of XPB implies that SP induces this degradation when XPB is part of the TFIIH complex, while RNAi or CRISPR/Cas9 affects expression of XPB with detrimental effects on the assembly of the whole TFIIH complex. Accordingly, following SP treatment we were able to immunoprecipitate a stable TFIIH complex containing its main subunits but depleted of XPB. Even if our strategy to degrade XPB by means of SP is better than CRISPR/Cas9 or RNAi, it also has its limitations and we can observe a decrease in the amount of other TFIIH subunits in case of long-term treatment (data not shown), indicating a destabilization of the TFIIH complex after several hours without XPB. With this tool in hand, it is, however, possible, in the first few hours post-SP treatment in MRC5 cells, to question specifically the role of the XPB subunit of TFIIH without interfering with the integrity of the complex.

Differential Impact of TFIIH Subunits in DNA Repair and Transcription

Depletion of XPB following SP treatment fully inhibited the repair of UV-induced DNA lesions, resulting in a higher sensitivity of cells to UV irradiation. NER inhibition is due to depletion of XPB because the upstream factor XPC (Volker *et al.*, 2001) accumulated normally at the lesions, while the downstream XPA factor failed to do so. In the absence of XPB, the recruitment of the other TFIIH subunits was also impaired, confirming the central role of this subunit in the recruitment of the whole TFIIH complex to damaged DNA (Oksenyich *et al.*, 2009). In contrast, THZ1 had no impact on DNA repair, confirming that CDK7 was not involved in NER (Araújo *et al.*, 2000; Coin *et al.*, 2008).

In marked contrast to NER, our study revealed that mRNA transcription was not affected by the absence of XPB. Paradoxically, mRNA transcription was highly sensitive to TPL but became largely resistant to it when cells were depleted of XPB. This observation is important because it indicates that the residual XPB protein remaining after SP treatment (less than 5% of XPB) cannot account for the normal mRNA transcription level observed in SP-treated cells because if this hypothesis were correct, TPL would continue to inhibit transcription even after SP treatment. Rather, it suggests that mRNA transcription indeed takes place in the absence of XPB. In a recent work, Ramirez and co-workers studied the impact of SP on HIV infection and observed that transcription of their reporters was not affected by the absence of XPB *in vivo* when the Tat protein was not expressed, supporting our observations (Lacombe *et al.*, 2016). Besides, we also noted that TPL affected 5EU nucleolar staining and consequently Pol I transcription, as previously observed (Nonnekens *et al.*, 2013), which suggests a role for XPB ATPase in rRNA transcription.

Does mRNA transcription require the rest of the TFIIH complex in the absence of XPB? Contrary to TPL, transcription inhibition by THZ1 was not affected by SP pre-treatment, indicating that even in the absence of XPB, the kinase activity of TFIIH was still necessary for transcription. We also observed that the p62 subunit of TFIIH was normally recruited to the promoter of active genes in RA-treated fibroblasts in the absence of XPB. Furthermore, the XPB-depleted TFIIH complex was active in a reconstituted transcription assay and its depletion from an SP-treated cell extract resulted in a significant drop of the transcription activity, suggesting that the absence of XPB does not prevent the rest of the complex from participating in transcription.

A Built-In Block Model in Class II Gene Transcription Initiation

Our work finally brings new insights into the mode of action of XPB in transcription initiation. In addition to the above observations, we also revealed that the introduction of mutations in the RecA domains of XPB rendered transcription initiation insensitive to TPL *in vitro*, a situation resembling that observed following the depletion of XPB *in vivo*.

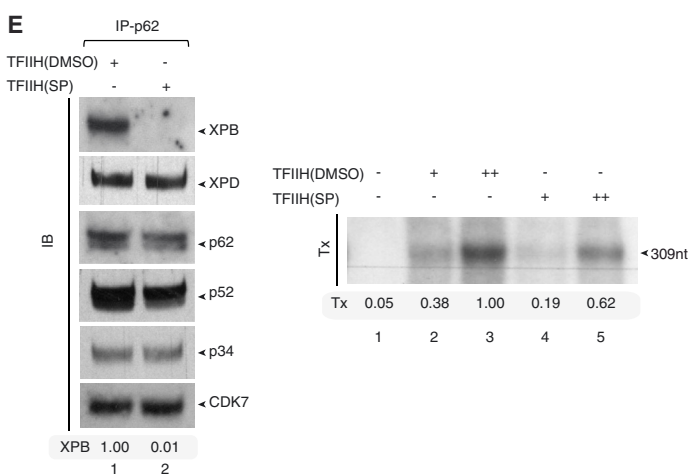
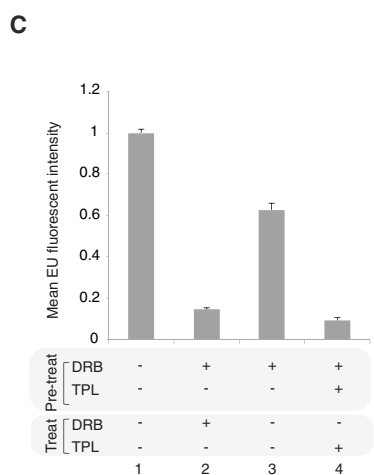
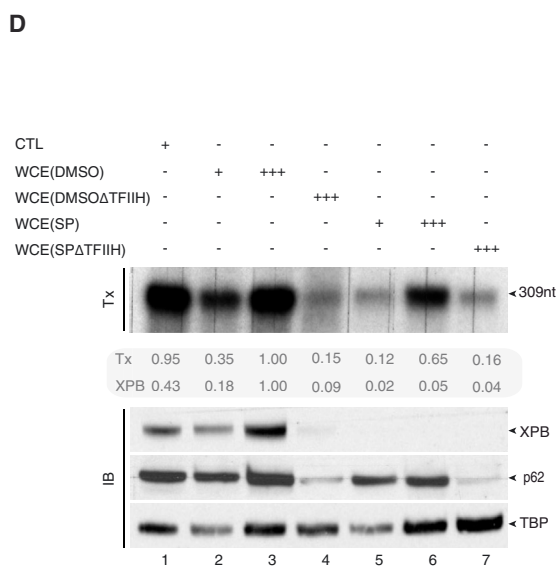
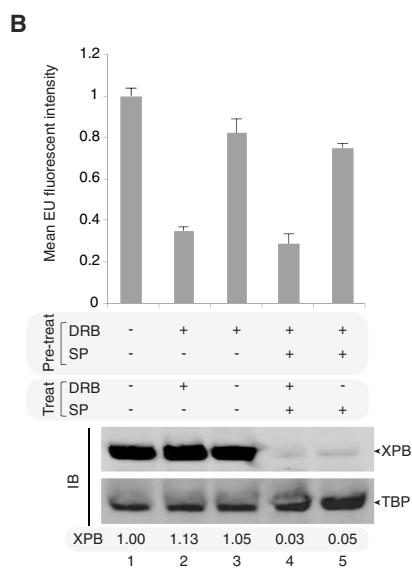
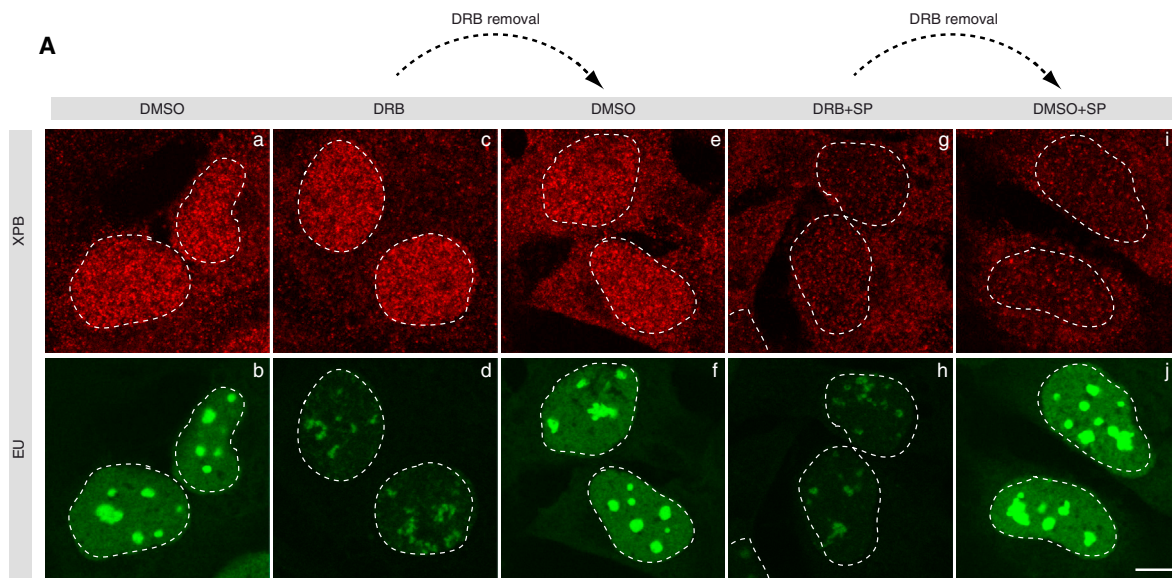
Among the various models of mRNA transcription initiation, the built-in block model proposed by J. Gralla for the yeast XPB homolog Ssl2 is the one that best fits our observations (Lin *et al.*, 2005). In this model, XPB/Ssl2 is intrinsically an inhibitor of transcription initiation imposing a block to promoter melting, relieved by its own ATPase activity in normal conditions, or by its artificial degradation by SP in our case. Given recent

(B) U2OS reporter cells were treated for 4 hr with either SP, THZ1, or TPL alone or pre-treated with SP for 4 hr and then treated for 2 hr in combination with another drug as indicated. Transcription was induced by the addition of dox for 6 hr in the presence of the drugs. Cells were subsequently lysed and extracts resolved by SDS-PAGE and immunoblotting either with anti-GFP or anti-XPB antibodies. XPB and CFP-SKL were quantified and normalized with YFP-MS2.

(C) Quantification of CFP-SKL nascent mRNA transcript accumulation has been performed in cells treated as in (B) after induction with dox for 4 hr. Data represent the percentage of cells showing accumulation of YFP-MS2 on the lacO localized by the binding of mCherry-LacR fusion protein. $n = 500$ cells were observed in three independent experiments. * $p < 0.05$.

(D) Quantification of Pol II and Pol II phosphoSerine 5 (Pol II Ser5P) accumulation at the reporter genomic locus in cells pre-treated with DMSO, TPL, or SP for 4 hr before induction with dox for 4 hr. Data represent the percentage of cells showing co-localization of Pol II or Pol II Ser5P with the MS2-YFP at the CFP-SKL locus. The values are the means of three independent experiments (\pm SEM). $n = 500$ cells were observed in each experiment.

(E and F) Cells were treated as in (D). Nascent transcripts were visualized by YFP-MS2 accumulation on nascent CFP-SKL transcript and XPB with either total Pol II (E) or Pol II Ser5P (F) and were immunostained, followed by fluorescent confocal microscopy.



(legend on next page)

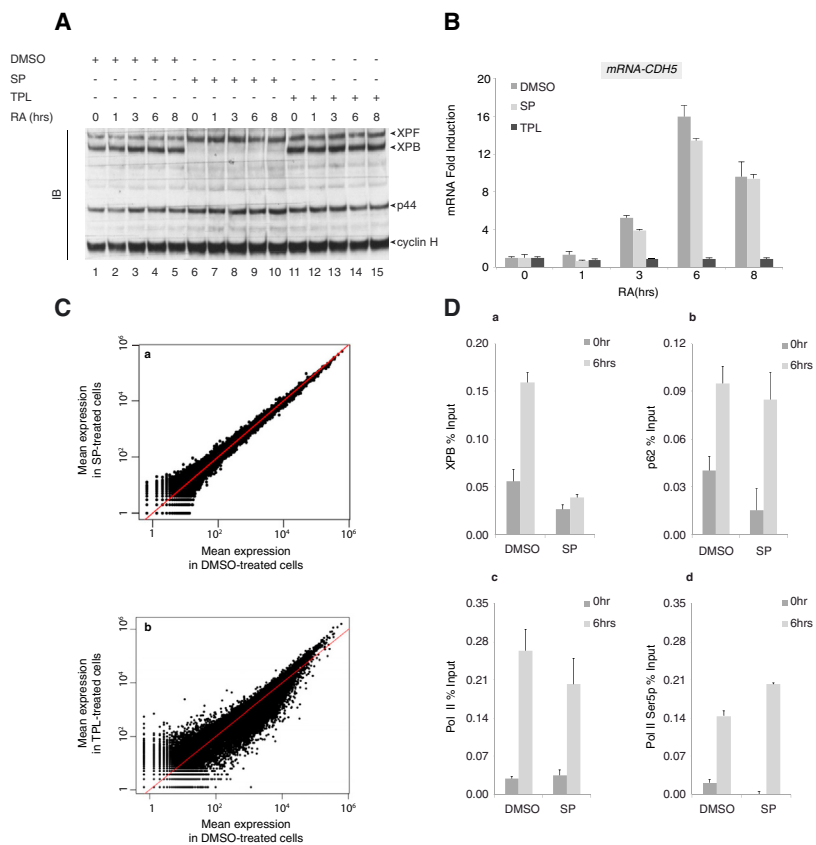


Figure 6. Depletion of XPB Allows RAR-Dependent Gene Transactivation

(A) MRC5 fibroblasts were pre-treated with either DMSO, SP, or TPL for 4 hr before addition of RA. Cells were harvested at different time points and extracts were loaded on SDS-PAGE and immunoblotted with anti-XPB, anti-p44, anti-CyclinH, and anti-XPF antibodies.

(B) MRC5 cells were treated as in (A) and relative mRNA expression of *CDH5* was measured by qRT-PCR at different time points after RA treatment. The values on the graph are plotted relative to the expression level of the no-RA-treatment control, which is set to 1 in all experiments. The values are the means of three independent experiments (\pm SD).

(C) RNA sequencing (RNA-seq) analysis scatter-plots show the relative level of transcription of all reads for (a) SP-treated cells versus DMSO, harvested at 6 hr post-RA treatment and (b) TPL-treated cells versus DMSO, harvested 6 hr post-RA treatment. Each black dot represents a gene. The first bisecting line is depicted in red. The y axis represents the mean expression in SP- or TPL-treated cells and the x axis represents the mean expression in DMSO-treated cells.

(D) ChIP monitoring the occupancy of XPB (a), the TFIIF subunit p62 (b), Pol II (c), and Pol II Ser5p (d) on the *CDH5* promoter in chromatin extracts from either DMSO- or SP-treated cells, 6 hr post-RA treatment. The values are the means of three independent experiments (\pm SD). Results are expressed as a percent of the inputs.

findings on XPB (Fishburn et al., 2015), we propose that the recruitment of TFIIF to the PIC induces the XPB-dependent block of DNA unwinding that is overcome by its ATP-dependent translocation along the DNA, followed by promoter melting achieved with the use of binding energy alone (Figure S3). A recent work resolved the structure of the human transcription initiation complex and provided support for a translocase activity of XPB inducing its relocation by 12 bp along the DNA during promoter melting (He et al., 2016). Another recent work unveiled that the pre-initiation open complex was the more stable structure in the absence of TFIIF (Plaschka et al., 2016). The built-in

block model was suggested for yeast, but our proposal to extend it to higher eukaryotes provides an explanation for those observations and predicts that addition of TFIIF in the absence of ATP would favor the closed complex. A difference between higher eukaryotes and yeast is the implication of Ssl2 in the scanning of the transcription start site (Fishburn et al., 2016). It is then not expected that transcription could take place in the absence of Ssl2 in yeast. Finally, this model also implies that class II gene expression evolved to include promoter melting as an additional step of gene regulation, under the control of XPB, ensuring timely expression of genes. It also brings into harmony the three

Figure 5. Nascent Transcription Accommodates the Absence of XPB

(A) MRC5 fibroblasts were pre-treated for 4 hr either with DMSO (a and b), DRB (c and d), or DRB+SP (g and h). When indicated, DRB was subsequently removed and cells were incubated in medium containing either DMSO (e and f) or SP (i and j) for 30 min. RNAs were subsequently labeled by 5EU incorporation and cells were immunostained with anti-XPB antibody, followed by fluorescent confocal microscopy. Scale bar, 10 μ m.

(B) MRC5 fibroblasts were pre-treated for 4 hr with either DMSO (lane 1), DRB (lanes 2 and 3), or DRB+SP (lanes 4 and 5). After pre-treatment, RNAs were labeled by 5EU incorporation in the presence of DMSO (lanes 1 and 3), DRB (lane 2), DRB+SP (lane 4), or SP (lane 5) and cells were lysed, resolved by SDS-PAGE, and immunoblotted with anti-XPB and anti-TBP antibodies. XPB was quantified and normalized with TBP.

(C) MRC5 fibroblasts were pre-treated for 4 hr with either DMSO (lane 1), DRB (lanes 2 and 3), or DRB+TPL (lanes 4). After pre-treatment, RNAs were labeled by 5EU incorporation in the presence of DMSO (lanes 1 and 3), DRB (lane 2), or TPL (lane 4).

(D) A total of 10 and 30 μ g of either WCE(DMSO) or WCE(SP) was tested in a run-off transcription assay (Tx) in vitro with a DNA template under the control of the AdMLP (Gerard et al., 1991). WCE(DMSO Δ TFIIF) and WCE(SP Δ TFIIF) were obtained by immunodepletion of TFIIF from WCE(DMSO) and WCE(SP), respectively, using anti-TFIIF/p62 antibody. Subsequently, 30 μ g of these extracts was tested in run-off transcription. CTL, 30 μ g WCE from HeLa cells was used as control. Size of the transcripts is indicated. Alternatively, WCEs were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-XPB, anti-p62, or anti-TBP antibodies (IB). XPB was quantified and normalized with TBP.

(E) Left panel, TFIIF(DMSO) and TFIIF(SP), immunoprecipitated from either WCE(DMSO) or WCE(SP) using anti-p62 antibody, were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted. XPB was quantified and normalized with p62. Right panel, approximately 100 and 200 ng TFIIF(DMSO) and TFIIF(SP) were tested in a re-constituted run-off transcription assay containing recombinant TBP, TFIIB, TFIIA, TFIIE, TFIIF, and purified Pol II.

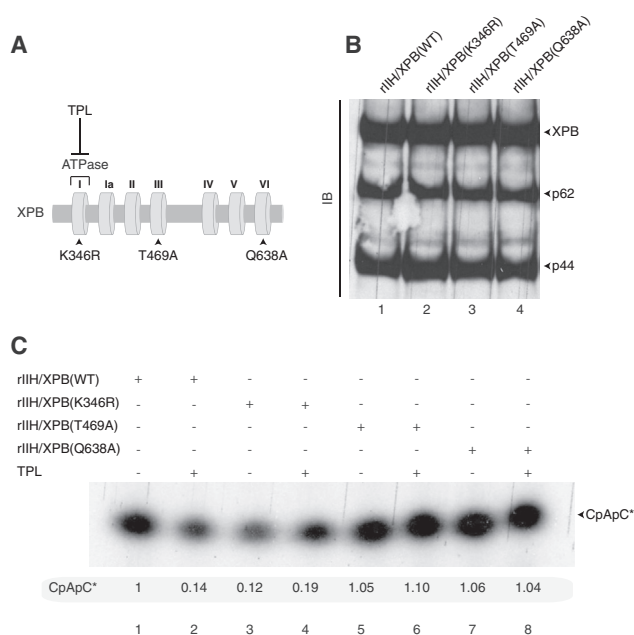


Figure 7. Mutation in the RecA Domains of XPB Abolishes ATP Requirement for Transcription Initiation

(A) Schematic representation of XPB. The light gray boxes indicate the helicase domains. Mutations in the ATP binding site (K346R) and in the helicase domains III and VI (T469A and Q638A) are depicted.

(B) A total of 100 ng rIIH/XPB(WT), rIIH/XPB(K346R), rIIH/XPB(T469A), and rIIH/XPB(Q638A) was purified and resolved by SDS-PAGE and immunoblotted.

(C) Abortive trinucleotide synthesis using CpA dinucleotide and radiolabeled CTP in the presence of rIIHs as indicated at the top of the figure. TPL was used when indicated. Radiolabeled CpApC was quantified.

mechanisms of DNA melting in class I, II, and III gene expression wherein DNA unwinding at the promoter only requires the energy released upon the creation of the PIC without the direct involvement of a helicase to break the hydrogen bonds keeping the two DNA strands together.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- [KEY RESOURCES TABLE](#)
- [CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING](#)
- [METHOD DETAILS](#)
 - Cell lines
 - 5EU incorporation assay
 - Run-off transcription
 - Abortive Initiation Reaction
 - Transactivation assay
 - ChIP experiments
 - Immunofluorescence-based DNA lesion quantification
 - Cell viability assays
 - Dual Incision
 - Immunofluorescence Staining
 - Quantification of actively transcribing cells
 - RNA-seq analysis

- [QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS](#)
- [DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY](#)

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes three figures and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.012>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.A., Z.N., and F.C. designed the experiments. S.A. and Z.N. conducted the main experiments. J.S. performed fluorescent imaging. N.L.M. performed RA-dependent gene activation assay. A.W. performed plate reading and statistical analysis of EU incorporation assay. F.C. supervised the experiments and subsequently wrote the manuscript with input from J.-M.E.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Roger Greenberg (University of Pennsylvania) for the U2OS reporter cell line, to members of our team for fruitful discussion, and particularly to Carlos Genes Robles for corrections. This study was supported by the Ligue contre Le cancer, équipe labellisée 2014, ANR (FRET-NET) and by the INCA (INCA_9378). This study was supported by the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02.

Received: August 9, 2016

Revised: November 7, 2016

Accepted: January 6, 2017

Published: February 2, 2017

REFERENCES

- Alekseev, S., Ayadi, M., Brino, L., Egly, J.M., Larsen, A.K., and Coin, F. (2014). A small molecule screen identifies an inhibitor of DNA repair inducing the degradation of TFIH and the chemosensitization of tumor cells to platinum. *Chem. Biol.* **21**, 398–407.
- Araújo, S.J., Tirode, F., Coin, F., Pospiech, H., Syväoja, J.E., Stucki, M., Hübscher, U., Egly, J.M., and Wood, R.D. (2000). Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIH, and modulation by CAK. *Genes Dev.* **14**, 349–359.
- Coin, F., Marinoni, J.C., Rodolfo, C., Fribourg, S., Pedrini, A.M., and Egly, J.M. (1998). Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIH. *Nat. Genet.* **20**, 184–188.
- Coin, F., Oksenysh, V., and Egly, J.M. (2007). Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol. Cell* **26**, 245–256.
- Coin, F., Oksenysh, V., Mocquet, V., Groh, S., Blattner, C., and Egly, J.M. (2008). Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIH. *Mol. Cell* **31**, 9–20.
- Compe, E., and Egly, J.M. (2016). Nucleotide excision repair and transcriptional regulation: TFIH and beyond. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 265–290.
- Drapkin, R., Reardon, J.T., Ansari, A., Huang, J.C., Zawel, L., Ahn, K., Sancar, A., and Reinberg, D. (1994). Dual role of TFIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature* **368**, 769–772.
- Fan, L., and DuPrez, K.T. (2015). XPB: An unconventional SF2 DNA helicase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **117**, 174–181.
- Feaver, W.J., Svestrup, J.Q., Bardwell, L., Bardwell, A.J., Buratowski, S., Gulyas, K.D., Donahue, T.F., Friedberg, E.C., and Kornberg, R.D. (1993). Dual roles of a multiprotein complex from *S. cerevisiae* in transcription and DNA repair. *Cell* **75**, 1379–1387.

- Feklistov, A., and Darst, S.A. (2011). Structural basis for promoter-10 element recognition by the bacterial RNA polymerase σ subunit. *Cell* **147**, 1257–1269.
- Fishburn, J., Tomko, E., Galburt, E., and Hahn, S. (2015). Double-stranded DNA translocase activity of transcription factor TFIIF and the mechanism of RNA polymerase II open complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 3961–3966.
- Fishburn, J., Galburt, E., and Hahn, S. (2016). Transcription start site scanning and the requirement for ATP during transcription initiation by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **291**, 13040–13047.
- Gerard, M., Fischer, L., Moncollin, V., Chipoulet, J.M., Chambon, P., and Egly, J.M. (1991). Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general transcription factor BTF2. *J. Biol. Chem.* **266**, 20940–20945.
- Goodrich, J.A., and Tjian, R. (1994). Transcription factors IIE and IIH and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II. *Cell* **77**, 145–156.
- Grünberg, S., Warfield, L., and Hahn, S. (2012). Architecture of the RNA polymerase II preinitiation complex and mechanism of ATP-dependent promoter opening. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 788–796.
- He, Y., Yan, C., Fang, J., Inouye, C., Tjian, R., Ivanov, I., and Nogales, E. (2016). Near-atomic resolution visualization of human transcription promoter opening. *Nature* **533**, 359–365.
- Holstege, F.C., van der Vliet, P.C., and Timmers, H.T. (1996). Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J.* **15**, 1666–1677.
- Jao, C.Y., and Salic, A. (2008). Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 15779–15784.
- Kandiah, E., Trowitzsch, S., Gupta, K., Haffke, M., and Berger, I. (2014). More pieces to the puzzle: recent structural insights into class II transcription initiation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **24**, 91–97.
- Keriel, A., Stary, A., Sarasin, A., Rochette-Egly, C., and Egly, J.M. (2002). XPD mutations prevent TFIIF-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RAR α . *Cell* **109**, 125–135.
- Kim, T.K., Ebricht, R.H., and Reinberg, D. (2000). Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIH. *Science* **288**, 1418–1422.
- Kwiatkowski, N., Zhang, T., Rahl, P.B., Abraham, B.J., Reddy, J., Ficarro, S.B., Dastur, A., Amzallag, A., Ramaswamy, S., Tesar, B., et al. (2014). Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature* **511**, 616–620.
- Lacombe, B., Morel, M., Margottin-Goguet, F., and Ramirez, B.C. (2016). Specific inhibition of HIV infection by the action of spironolactone in T cells. *J. Virol.* **90**, 10972–10980.
- Le May, N., Iltis, I., Amé, J.C., Zhovmer, A., Biard, D., Egly, J.M., Schreiber, V., and Coin, F. (2012). Poly (ADP-ribose) glycohydrolase regulates retinoic acid receptor-mediated gene expression. *Mol. Cell* **48**, 785–798.
- Lin, Y.C., Choi, W.S., and Gralla, J.D. (2005). TFIIF XPB mutants suggest a unified bacterial-like mechanism for promoter opening but not escape. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 603–607.
- Miller, G., and Hahn, S. (2006). A DNA-tethered cleavage probe reveals the path for promoter DNA in the yeast preinitiation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 603–610.
- Murakami, K., Elmlund, H., Kalisman, N., Bushnell, D.A., Adams, C.M., Azubel, M., Elmlund, D., Levi-Kalishman, Y., Liu, X., Gibbons, B.J., et al. (2013). Architecture of an RNA polymerase II transcription pre-initiation complex. *Science* **342**, 1238724.
- Nonnekens, J., Perez-Fernandez, J., Theil, A.F., Gadal, O., Bonnart, C., and Giglia-Mari, G. (2013). Mutations in TFIIF causing trichothiodystrophy are responsible for defects in ribosomal RNA production and processing. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2881–2893.
- Ohkuma, Y., and Roeder, R.G. (1994). Regulation of TFIIF ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation. *Nature* **368**, 160–163.
- Oksenyich, V., Bernardes de Jesus, B., Zhovmer, A., Egly, J.M., and Coin, F. (2009). Molecular insights into the recruitment of TFIIF to sites of DNA damage. *EMBO J.* **28**, 2971–2980.
- Oksenyich, V., Zhovmer, A., Ziani, S., Mari, P.O., Eberova, J., Nardo, T., Stefanini, M., Giglia-Mari, G., Egly, J.M., and Coin, F. (2013). Histone methyltransferase DOT1L drives recovery of gene expression after a genotoxic attack. *PLoS Genet.* **9**, e1003611.
- Plaschka, C., Hantsche, M., Dienemann, C., Burzinski, C., Plietzko, J., and Cramer, P. (2016). Transcription initiation complex structures elucidate DNA opening. *Nature* **533**, 353–358.
- Riedl, T., Hanaoka, F., and Egly, J.M. (2003). The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J.* **22**, 5293–5303.
- Schaeffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncollin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., Chambon, P., and Egly, J.M. (1993). DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIF) basic transcription factor. *Science* **260**, 58–63.
- Shanbhag, N.M., Rafalska-Metcalf, I.U., Balane-Bolivar, C., Janicki, S.M., and Greenberg, R.A. (2010). ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell* **141**, 970–981.
- Singh, J., and Padgett, R.A. (2009). Rates of in situ transcription and splicing in large human genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1128–1133.
- Timmers, H.T. (1994). Transcription initiation by RNA polymerase II does not require hydrolysis of the beta-gamma phosphoanhydride bond of ATP. *EMBO J.* **13**, 391–399.
- Tirole, F., Busso, D., Coin, F., and Egly, J.M. (1999). Reconstitution of the transcription factor TFIIF: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol. Cell* **3**, 87–95.
- Titov, D.V., Gilman, B., He, Q.L., Bhat, S., Low, W.K., Dang, Y., Smeaton, M., Demain, A.L., Miller, P.S., Kugel, J.F., et al. (2011). XPB, a subunit of TFIIF, is a target of the natural product triptolide. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 182–188.
- Vannini, A., and Cramer, P. (2012). Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries. *Mol. Cell* **45**, 439–446.
- Volker, M., Moné, M.J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., van Driel, R., van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H. (2001). Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol. Cell* **8**, 213–224.
- Zurita, M., and Merino, C. (2003). The transcriptional complexity of the TFIIF complex. *Trends Genet.* **19**, 578–584.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
(6-4) photoproducts (64M-2)	Cosmo Bio	CAC-NM-DND-002; RRID: AB_1962842
XPB (Immunoblotting)	IGBMC Antibody Facility	1B3
XPB (S-19) (Immunofluorescence)	Santa Cruz	sc-293; RRID: AB_2262177
p62 (Immunoblotting)	IGBMC Antibody Facility	3C9
p62 (Q-19) (Immunofluorescence)	Santa Cruz	sc-292; RRID: AB_2114675
XPD	IGBMC Antibody Facility	2F6
p52	IGBMC Antibody Facility	1D11
p44	IGBMC Antibody Facility	1H5
p34	IGBMC Antibody Facility	1A12
CDK7	IGBMC Antibody Facility	2F8
TBP	IGBMC Antibody Facility	3G3
RPB1 (RNA Pol II)	IGBMC Antibody Facility	7C2
RNA polIII CTD phospho Ser5 antibody, clone 3E8	Active Motif	61085
XPC	Bethyl Laboratories	A301-122A; RRID: AB_2288476
GFP	Acris Antibodies	TP401
Peroxydase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson Immuno Research	111-035-144; RRID: AB_2307391
Peroxydase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG	Jackson Immuno Research	715-035-151; RRID: AB_2340771
Alexa Fluor 546 goat anti rabbit igG	Life technologies	A110035
Alexa Fluor 488 goat anti mouse igG	Life technologies	A11001
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Tet-System approved FBS	Clontech	631106
G418 disulfate salt solution	Sigma Aldrich	G8168
Hygromycin B solution from Streptomyces hygroscopicus	Sigma Aldrich	H0654
Puromycin	InvivoGen	Ant-pr, lot QLL-35-33A
ProLong Gold antifade Mountant	ThermoFisher Scientific	P36930
Doxycycline Hyclate	Sigma Aldrich	D9891
ATP	GE Healthcare Europe	27-2056-61
CTP	Life Technologies SAS	R0451
UTP	GE Healthcare Europe	27-2086-61
[α - ³² P] CTP	Hartmann Analytic GMBH – Bioactif EUR	SRP-209
Critical Commercial Assays		
Click-iT RNA Alexa Fluor 488 Imaging Kit	Invitrogen	C10329
ProLong Gold Antifade Mountant	Invitrogen	P36930
Deposited Data		
RNA-seq	Gene Expression Omnibus	GEO: GSE93206
Experimental Models: Cell Lines		
U2OS pTuner 2-6-3	Shanbhag et al., 2010	N/A
MRC5	fetal lung fibroblast-like	Dr A. Sarasin, UPR 2169 CNRS, Villejuif, France

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Recombinant DNA		
AdMLP DNA		Gerard et al., 1991
pAK309		Gerard et al., 1991
Sequence-Based Reagents		
RT-PCR		
GAPDHq	AGCTCACTGGCATGGCCTTC	ACGCCTGCTTCACCACCTTC
CDH5	AGCCAGCCCAGCCCTCAC	CCTGTCAGCCGACCGTCTTTG
RARbeta2	CCAGCAAGCCTCCATGTTC	TACACGCTCTGCACCTTTAGC
SMAD3	ttgtccagtctccaactgtaac	gtcaactggtagacagcctcaaa
ChIP		
CDH5 promotor	AGCCAGCCCAGCCCTCAC	CCTGTCAGCCGACCGTCTTTG
Software and Algorithms		
ImageJ	NIH	N/A
Other		
Sonicator Q800R		Qsonica
Ligthcycler 480		Roche
QuantiTect SYBR Green	QIAGEN	1037795
IN Cell Analyzer 1000 imaging system	(GE Healthcare)	N/A

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

As Lead Contact, Frederic Coin is responsible for all reagent and resource requests. Please contact Frederic Coin at fredr@igbmc.fr with requests and inquiries.

METHOD DETAILS**Cell lines**

Reporter cells (U2OS) were kindly provided by Roger A Greenberg (Abramson Family Cancer Research Institute, University of Pennsylvania) were cultured in DMEM (GIBCO) containing 10% Tet-system approved FBS (Clontech), 1% Penicillin/Streptomycin, 400 µg/ml G418, 100 µg/ml Hygromycin B and 2 µg/ml puromycin.

5EU incorporation assay

RNA labeling by 5EU incorporation was performed with Click-IT RNA Imaging kits (Invitrogen) following the manufacturer protocol with the following modifications; 5EU was used at 0.2mM and labeling was performed during 1hr. 5EU signal intensity was quantified using the IN Cell Analyzer 1000 imaging system (GE Healthcare). The values of 5EU signal intensity are the means of four independent experiments (\pm SD) and $n = 2500$ cells were analyzed in each experiment.

Run-off transcription

Reaction mixtures of 12 µL containing 50ng of linear AdMLP DNA template and increasing amounts of WCE (10 and 30 µg) were pre-incubated for 15 min at 30°C in transcription buffer (20mM HEPES (pH 7.9), 7mM MgCl₂, 55mM KCl) and transcription was initiated by the addition of 2 µL nucleotide solution to final concentrations of 600 µM UTP, ATP, GTP and 0.6 µM [α -³²P] CTP. Reactions were carried out for 30 min and then stopped by the addition of 0.5 µL of 0.5 M EDTA (pH 8). The resulting RNA transcripts were analyzed on an 8% denaturing polyacrylamide gel.

The reconstituted run-off transcription assay was performed using AdMLP DNA template, immunoprecipitated TFIID and recombinant TFIIB, TFIIA, TFIIF, TBP together with purified RNA pol II as described ([Gerard et al., 1991](#)).

Abortive Initiation Reaction

Preinitiation complexes were assembled using 300ng of pAK309 containing the AdML promoter, 4ng of TBP, 2ng of TFIIB, 160ng of TFIIF, 26ng of TFIIA, and 200ng of TFIID plus 1 unit of Pol II (HAP fraction) in a mixture containing 0.4mg/ml bovine serum albumin and 5mM MgCl₂. After preinitiation complex assembly at 28°C for 30 min, phosphodiester bond synthesis was initiated by the addition of priming dinucleotides CpA (0.5mM) plus 6.5mM MgCl₂, 4 µM dATP or ATP γ S, and 1 µM radioactive [α -³²P] CTP. After 30 min of

synthesis of the trinucleotide, the reactions were stopped in the presence of 100mM EDTA and 0.5 mg/ml proteinase K. Routinely 10 μ L of the reactions was loaded to a 20% acrylamide (19:1 acryl/bisacryl), 8.3M urea gel and run at 20 W constantly for 2–2.5hrs.

Transactivation assay

RAR-dependent gene activation was performed as described (Keriel et al., 2002). Briefly, 10^6 MRC5 cells were incubated with medium in a 10cm cell culture dish for 24hrs. 12hrs before ligand treatment, cells were incubated with phenol red-free medium containing 10% charcoal treated FCS and 40 μ g/ml gentamycin. Cells were treated with 10 μ M all-trans retinoic acid (RA).

ChIP experiments

ChIP experiments were performed on mouse J1 embryonic stem cells passaged 2 times with feeders and 3 times on gelatin plates upon de-freezing. The cells were treated with 10 μ M SP or control diluent DMSO for 24hrs. The chromatin was prepared using ChIP-IT High Sensitivity kit (Active Motif) according to the producer's instructions.

Immunofluorescence-based DNA lesion quantification

One thousand MRC5 cells were plated per well of a 96-well plate (OptiPlates-96, Perkin Elmer). Twenty-four hr later, cells were UV-irradiated with UV-C lamp (60J/m²) and recovered in fresh medium for 3hrs at 37°C, 5% CO₂. Immuno-labeling of (6-4)PP was performed using mouse 64M-2 antibody. DNA was denatured with 2M HCl for 30 min at RT and blocked in 10% BSA in PBS for 15 min prior to labeling. (6-4) PP lesions were quantified using an IN Cell Analyzer 1000 imaging system (GE Healthcare) and the percentage of (6-4) PP removal was determined (100% represents the amount of lesions determined just after UV irradiation). The values are the means of four independent experiments (\pm SD) and n = 2500 cells were observed in each experiment.

Cell viability assays

MRC5 cells were plated (25 000 cells per well in 6-well petri dishes), cultured overnight, treated with SP (10 μ M) or DMSO for 4hrs and irradiated with various doses of UV-C (Philips TUV lamp, predominantly 254 nm). After 4 days of culturing in the presence of SP or DMSO, the cells were stained with 0.2% Crystal Violet (Sigma). After washing with tap water and drying, the stain was solubilized with 1% SDS and the optical density was measured by 96-well plate reader (595nm). All values are averages of at least 3 independent experiments each done in duplicate.

Dual Incision

Dual incision was carried out with increasing amount of WCE (10 and 20 μ g). Briefly, the assay was carried out in 25 μ L of incision buffer (45mM HEPES-KOH (pH7.8), 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.3mM EDTA, 10% glycerol, 2.5 μ g BSA, 50mM KCl) supplemented with 2mM ATP. Following pre-incubation 10 min at 30°C, 30ng of monodamaged Platinum DNA was added and reaction was continued for 30 min at 30°C. The excised fragment was detected on 14% urea-acrylamide after annealing with 9ng of the complementary oligonucleotide and addition of four radiolabeled dCMP α -P³² (3000 μ Ci/mmol) residues by Sequenase V2.1 (USB).

Immuofluorescence Staining

Immuofluorescence staining was routinely performed on PFA fixed cells after permeabilization with PBS-Triton (0.5%) and blocking with 10% heat inactivated FCS. Secondary antibodies were purchased from Invitrogen. Cells were stained with DAPI and mounted using ProLong Gold antifade agent (Invitrogen).

Quantification of actively transcribing cells

U2OS pTuner cells were induced by 1mg/ml Doxycycline for 6hrs in the presence of transcription inhibitors or control diluent (DMSO). Cells were fixed and the number of cells harboring an YFP-MS2 spot counted (n = 500). Results of three independent experiments are shown with SEM. For quantifying Pol II or Pol II ser5P accumulation on the transcribing spot cells were treated with Dox for 6hrs in the presence of transcription inhibitors and then fixed. Following immunolabelling of XPB and Pol II, the % of cells with detectable YFP-MS2 spot (ongoing transcription) colocalizing with the Pol II signal was determined.

RNA-seq analysis

Total RNA from cells treated as indicated was extracted using GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma). RNA quality was verified by analysis on the 2100 Bioanalyzer (Agilent). After isolation of total cellular RNA from 6 samples, libraries of template molecules suitable for high throughput cDNA sequencing were created using “TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit” (Illumina). The first step was to purify the poly-A containing mRNA molecules using poly-T oligo attached magnetic beads. Following purification, the mRNA was fragmented into small pieces using divalent cations at 94°C for 8 min. The cleaved RNA fragments were copied into first strand cDNA using reverse transcriptase and random primers. Strand specificity was achieved by replacing dTTP with dUTP in the Second Strand Marking Mix, followed by second strand cDNA synthesis using DNA Polymerase I and RNase H. (The incorporation of dUTP in second strand synthesis quenches the second strand during amplification, because the polymerase used in the assay is not incorporated past this nucleotide. The addition of Actinomycin D to First Stand Synthesis mix prevents spurious DNA-dependent synthesis, while allowing RNA-dependent synthesis, improving strand specificity). These double stranded

cDNA fragments then had the addition of a single 'A' base and subsequent ligation to double stranded adapters. The products were purified and enriched with PCR (30 sec at 98°C; [10 sec at 98°C, 30 sec at 60°C, 30 sec at 72°C] x 12 cycles; 5 min at 72°C) to create the cDNA library. Then surplus PCR primers were removed by purification using AMPure XP beads (Beckman) and the final cDNA libraries were checked for quality and quantified using 2100 Bioanalyzer (Agilent). These libraries were sequenced on the Illumina HiSeq 4000 as Single-end 50 base reads following Illumina's instructions. Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

The statistical analysis of experimental data was performed using a Student's paired t test, and results are presented as mean \pm standard deviation (SD). p values are shown.

DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

The accession number for the RNA-seq data reported in this paper is GEO: GSE93206.

Molecular Cell, Volume 65

Supplemental Information

**Transcription without XPB Establishes
a Unified Helicase-Independent Mechanism
of Promoter Opening in Eukaryotic Gene Expression**

Sergey Alekseev, Zita Nagy, Jérémy Sandoz, Amélie Weiss, Jean-Marc Egly, Nicolas Le May, and Frederic Coin

Supplemental Data Legends

Figure S1, related to Figure 1: (A); To set up the conditions to quantify transcription with the Click-iT RNA Imaging kits we performed 5EU incorporation assay for different times as indicated at 0.2mM concentration of 5EU (5 times less than indicated by Invitrogen). Following incubation, intensity was determined and set up to 1 for the 1hr incubation period. The results indicate that 1hr incubation period at 0.2mM of 5EU is in the middle of the linear part of the curve. The values of 5EU signal intensity are the means of four independent experiments (\pm SD) and n=2500 cells were analyzed in each experiment. **(B);** Left panel, to titrate XPB in CE(SP), 0.5, 2, 5, 10, 15 and 20 μ g of CE(DMSO) and 20 μ g of CE(SP) were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-XPB and anti-TBP antibodies. Right Panel, XPB signal was measured using ImageJ software and plotted on the graph as a function of the CE amount. **(C);** MRC5 cells were incubated with either DMSO, act D at 0.1 μ g/ml or 2 μ g/ml for 1hr followed by 5EU staining. Pol I transcription is inhibited at 0.1 μ g/ml, Pol II is inhibited at 2 μ g/ml and Pol III at 5 μ g/ml (Jao and Salic, 2008). Nucleolar 5EU staining is sensitive to 0.1 μ g/ml of act D indicating that it is Pol I-dependent 5EU incorporation. Nucleoplasmic 5EU staining is sensitive to 2 μ g/ml of act D indicating that it is mainly Pol II-dependent 5EU incorporation.

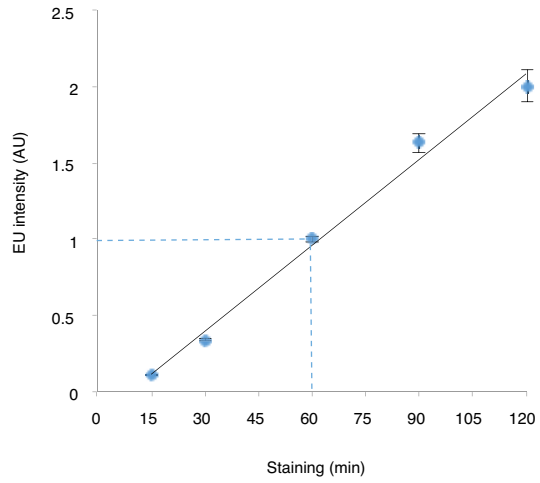
Figure S2, related to Figure 6 : (A-B); Relative mRNA expression of *SMAD3* **(A)** or *RARb2* **(B)** in cells treated either with DMSO, SP or TPL (pre-treatment 4hrs, maintained during the time course) measured at different time points after RA-treatment. The values are plotted relative to the expression level of the no RA treatment control that is set to 1 in all experiments. The values are the means of three independent experiments (\pm SD). **(C),** Hierarchical clustering of all samples of the RNA-seq experiment was calculated using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) with the SERE coefficient (Schulze et al., 2012) as the distance measure.

Figure S3, related to Figure 7: Model of transcription initiation

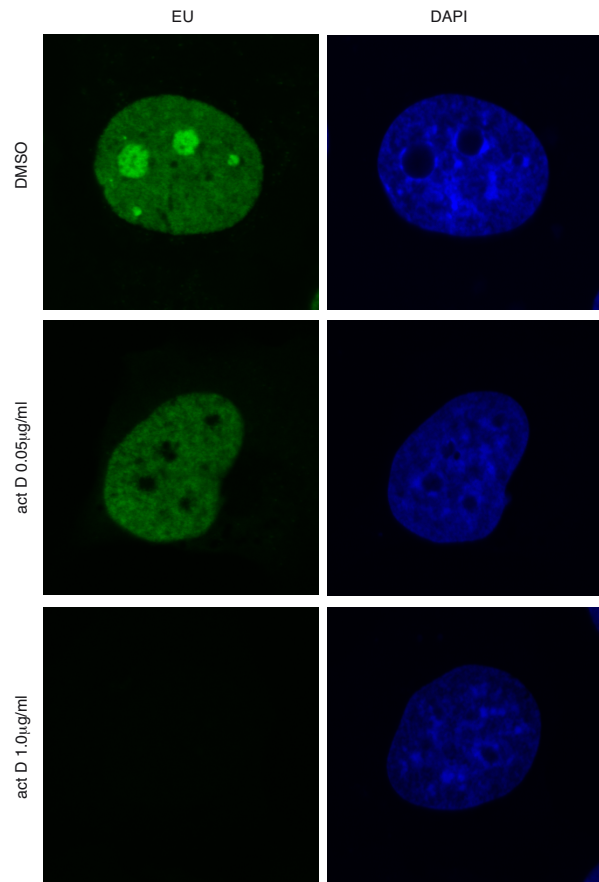
We propose a built-in block model to explain the role of XPB in transcription initiation. In this model, XPB is intrinsically an inhibitor of transcription initiation imposing a block to DNA melting. Following ATP consumption, the translocase activity of XPB displaces XPB from the upstream part of the promoter by 12 base pairs along the DNA leading to DNA unwinding and positioning of the transcription start site into the active site of Pol II. TPL, by inhibiting XPB ATPase and XPB translocation, impairs transcription initiation. SP can overcome this inhibition by degrading XPB and allowing transcription independently of ATP.

Table S1, related to Figure 6: Full list of genes of the RNA-seq assay with their amount in the different samples analyzed as indicated at the top of the file.

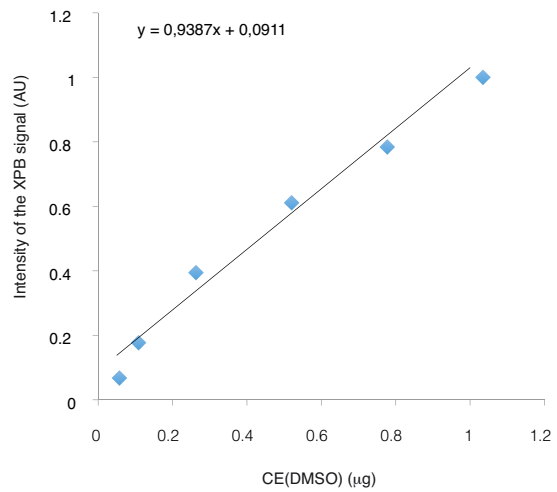
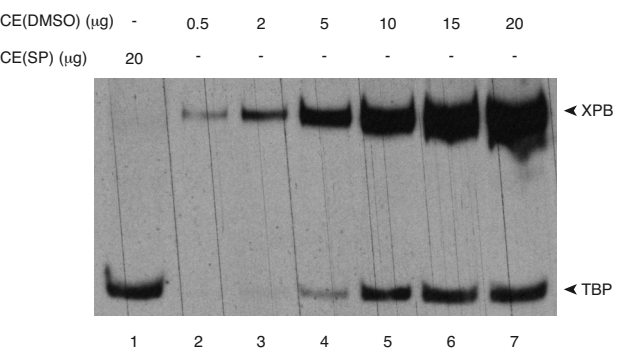
A



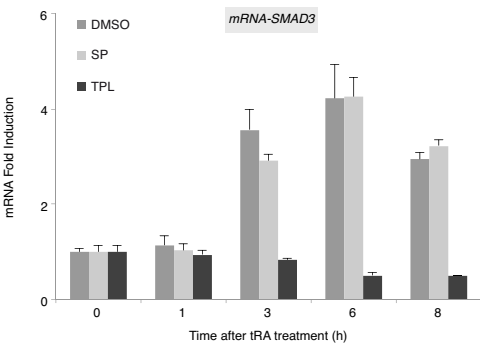
C



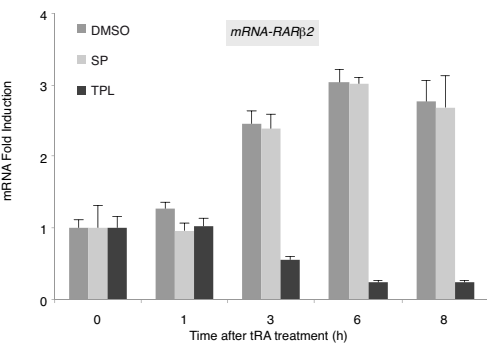
B



A



B



C

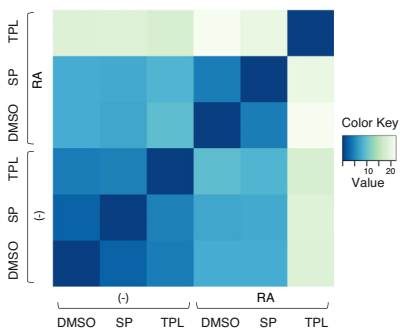
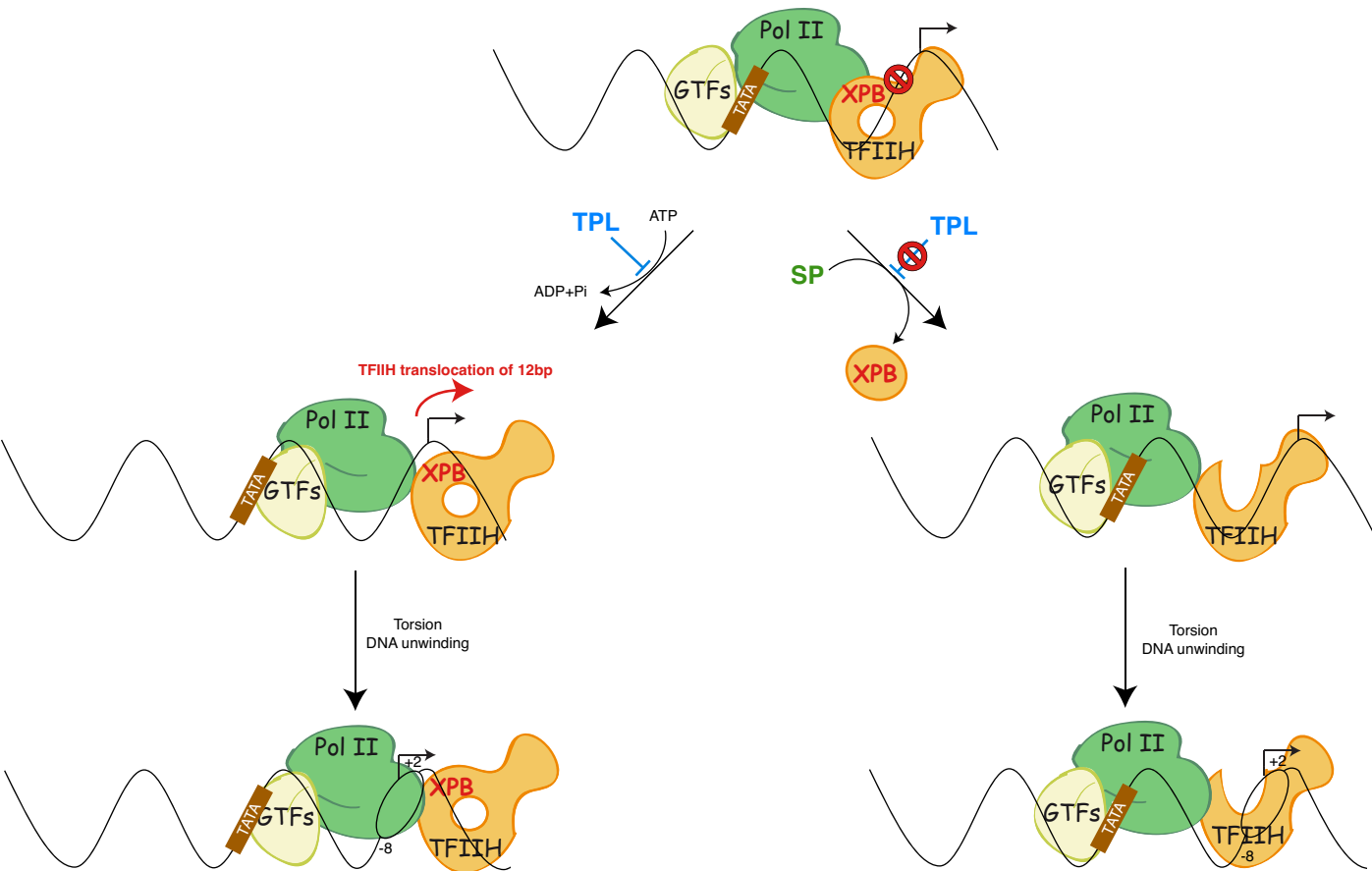


Figure S3



Seconde partie

**Functional interplay between TFIIH and KAT2A
regulates higher-order chromatin structure and
class II gene expression**

Jérémy Sandoz, Zita Nagy, Philippe Catez, Gizem Caliskan, Sylvain
Geny, Jean-baptiste Renaud, Jean-Paul Concordet, Arnaud
Poterszman, Laszlo Tora, Jean-Marc Egly, Nicolas Le May and
Frédéric Coin


Département de génomique fonctionnelle et Cancer, CNRS, INSERM,
Université de Strasbourg, Institut de Génétique et de Biologie
Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch-
Graffenstaden, France

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09270-2>

OPEN

Functional interplay between TFIIH and KAT2A regulates higher-order chromatin structure and class II gene expression

Jérémy Sandoz^{1,2,3,4}, Zita Nagy^{1,2,3,4}, Philippe Catez^{1,2,3,4}, Gizem Caliskan^{1,2,3,4}, Sylvain Geny⁵, Jean-Baptiste Renaud⁵, Jean-Paul Concordet⁵, Arnaud Poterszman^{1,2,3,4}, Laszlo Tora^{1,2,3,4} , Jean-Marc Egly^{1,2,3,4}, Nicolas Le May^{1,2,3,4} & Frédéric Coin^{1,2,3,4}

The TFIIH subunit XPB is involved in combined Xeroderma Pigmentosum and Cockayne syndrome (XP-B/CS). Our analyses reveal that XPB interacts functionally with KAT2A, a histone acetyltransferase (HAT) that belongs to the hSAGA and hATAC complexes. XPB interacts with KAT2A-containing complexes on chromatin and an XP-B/CS mutation specifically elicits KAT2A-mediated large-scale chromatin decondensation. In XP-B/CS cells, the abnormal recruitment of TFIIH and KAT2A to chromatin causes inappropriate acetylation of histone H3K9, leading to aberrant formation of transcription initiation complexes on the promoters of several hundred genes and their subsequent overexpression. Significantly, this cascade of events is similarly sensitive to KAT2A HAT inhibition or to the rescue with wild-type XPB. In agreement, the XP-B/CS mutation increases KAT2A HAT activity *in vitro*. Our results unveil a tight connection between TFIIH and KAT2A that controls higher-order chromatin structure and gene expression and provide new insights into transcriptional misregulation in a cancer-prone DNA repair-deficient disorder.

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire Illkirch Cedex, C.U. Strasbourg, France. ²Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, 67404 Illkirch, France. ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1258, 67404 Illkirch, France. ⁴Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France. ⁵Laboratoire Structure et Instabilité des Génomes, INSERM U1154, CNRS UMR7196, Muséum national d'Histoire naturelle, 43 rue Cuvier, 75005 Paris, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.C. (email: fredr@igbmc.fr)

The transcription factor IIF (TFIIF) is composed of ten subunits; XPB, p62, p52, p44, p34, and p8/TTDA which form the core complex, cdk7, MAT1, and cyclin H which form the cdk-activating kinase (CAK) sub-complex, linked to the core by XPD. In addition to its role as a basal transcription factor involved in RNA polymerase (Pol) II-dependent gene expression, TFIIF has also been implicated in nucleotide excision repair (NER)¹. Inherited mutations in genes encoding three subunits of TFIIF lead to genetic disorders. Mutations in XPB trigger xeroderma pigmentosum (XP) combined with Cockayne syndrome (XP/CS) or trichothiodystrophy (TTD), mutations in XPD trigger XP alone, XP/CS or TTD and mutations in TTDA trigger only TTD^{2–4}. These diseases have a broad spectrum of clinical features, including photosensitivity of the skin and high cancer predisposition mainly due to DNA repair deficiency and developmental and neurological defects likely related to transcriptional deregulation⁵. Consistent with the latter hypothesis, it has been shown in recent years that there are defects in several transcription activation pathways in XP/CS or TTD cells⁵.

XPB is a central TFIIF subunit that belongs to the SF2 helicase group, which is highly conserved in eukaryotes^{6–8}. XPB has two highly conserved core RecA-like helicase domains (HD1 and HD2), which are found in all SF2 members⁹. Eukaryotic XPB also contains N- and C-terminal domains (NTD and CTD) that flank the central HD1 and HD2^{6,10}. Interestingly, two of the three amino-acid substitutions in XPB found in XP/CS and TTD patients (F99S and T119P, respectively) are located in the NTD (from residues 1 to 320). XPB interacts with the p52 subunit of TFIIF through its NTD, resulting in an increase in its ATPase activity. The XP-B/CS F99S mutation weakens the XPB–p52 interaction and reduces anchoring of TFIIF to damaged DNA, which would explain the NER defect in related patients¹¹. Although the NTD of XPB is clearly implicated in two rare genetic disorders, its role and the impact of XP-B/CS and TTD mutations on its function have been insufficiently studied.

To better understand the role of the NTD of XPB and the impact of human XPB mutations on cellular homeostasis, we tethered several XPB mutants to chromatin using the lacO/LacR reporter system^{12,13}, and analyzed chromatin structure using confocal microscopy and three-dimensional (3-D) reconstruction of the cell nucleus. We first showed that the deletion of XPB NTD induces large chromatin decondensation. We then demonstrated that the XP-B/CS mutation (F99S) mimicks the deletion of the NTD by inducing a similar chromatin decondensation, but the TTD mutation (T119D) does not. In order to address the mechanisms, we demonstrated that TFIIF/XPB interacts with KAT2A (GCN5), a histone acetyltransferase (HAT) that is a subunit of the Spt Ada Gcn5 acetyltransferase (hSAGA) and Ada two A-containing (hATAC) complexes^{14–16}. Using an *in vitro* histone acetyltransferase assay, we observed that TFIIF-XPB^{F99S} strongly enhances the enzymatic activity of KAT2A. Cells derived from the corresponding XP-B/CS patient have a global increase in H3K9 acetylation and a decrease of H3K9 methylation that trigger overexpression of several hundred genes. We further showed that co-recruitment of TFIIF-XPB^{F99S} and KAT2A on chromatin results in the accumulation of the H3K9ac mark and the formation of Pol II initiation complexes at the promoters of overexpressed genes. We were able to restore the chromatin state, the promoter occupancy and the transcription program by expressing wild-type XPB or by inhibiting KAT2A HAT activity, highlighting the close relationship that exists between these two fundamental cellular actors.

Results

Tethered XPB mutants induce large chromatin decondensation. To directly assess the impact of XPB NTD on chromatin structure

and organization, we first used the lac operator-repressor (lacO-LacR) tethering system^{12,13}. Constructs that express the lac repressor DNA binding domain (LacR) fused in frame to XPB and GFP were transfected into the human U2OS17 cells that have repetitive binding sites for lacO integrated in the genome¹⁷ (Fig. 1a). GFP facilitates monitoring the proteins on chromatin. Given the implication of XPB NTD in human disease, we tested three XPB NTD mutants that include a complete NTD deletion (XPB^{320–782}), a substitution (XPB^{F99S}) expressed in XP-B/CS patient-derived cells (XPCS1BA = XP-B/CS^{F99S}) and a substitution (XPB^{T119P}) expressed in TTD patient-derived cells (TTD6VI = TTD-XPB^{T119P}). We also tested a large truncation of the C-terminus that deletes the CTD and HD2 (XPB^{1–550}) domains (see XPB^{WT}-LacR-GFP, XPB^{320–782}-LacR-GFP, XPB^{F99S}-LacR-GFP, XPB^{T119P}-LacR-GFP, and XPB^{1–550}-LacR-GFP; Fig. 1b, c; the western blot shows that the constructs express expected levels of appropriately-sized proteins).

Expression of LacR-GFP in U2OS17 cells^{13,18} marked the lacO repeat clusters with small condensed dots (Fig. 1d). We did not observe these “GFP” spots in the parental U2OS cells that do not have the lacO repeat cluster and that were transfected under the same conditions¹³. After transient transfection of the XPB-fused constructs, we observed that tethering of the NTD deletion mutant XPB^{320–782}-LacR-GFP to the lacO arrays caused the transformation of the small condensed dots into unshaped and fiber-like structures, whereas tethering of wild-type XPB (XPB^{WT}-LacR-GFP construct) did not induce this decondensation (Fig. 1d). Interestingly, the XP-B/CS mutant also induced chromatin decondensation that was comparable to that exhibited by the NTD deleted mutant (Fig. 1d). In contrast, array decondensation was not observed after the tethering of the TTD point or CTD deletion mutants (Fig. 1d). To rule out that overexpression of the LacR repressor alone was responsible for array decondensation, we used a higher transfection level of LacR-GFP (corresponding to 5× of the amount transfected above) (Fig. 1c) and observed no opening of the arrays in these conditions (Fig. 1d). More than 80% of the transiently transfected cells showed decondensation of at least one lacO array/cell in U2OS17 cells transfected with XPB^{F99S}-LacR-GFP or XPB^{320–782}-LacR-GFP, while no decondensation was observed with LacR-GFP at low or high transfection levels (Supplementary Fig. 1a). In addition, low level expression of XPB^{F99S}-LacR-GFP in stably transfected U2OS17 cells still induced consistent chromatin decondensation compared to XPB^{WT}-LacR-GFP (Supplementary Fig. 1b). Finally, robust unfolding of chromatin fibers was also observed after transient transfection of XPB^{320–782}-LacR-GFP and XPB^{F99S}-LacR-GFP into the A0-3 hamster reporter cell line¹² (Supplementary Fig. 1c), suggesting that XPB^{F99S} and XPB^{320–782}-mediated decondensation is a general phenomenon.

To quantify the size of the LacR-bound arrays, we used rapid confocal microscopy and 3-D reconstruction of the images (Fig. 1e). The images were taken 24 h after transfection of the LacR-GFP constructs and the volume filled with the GFP signal in 3-D was measured and normalized by the volume of the nucleus in 3-D. We found an average fivefold increase in the size of the array following the tethering of XPB^{320–782} or XPB^{F99S} mutants compared to XPB^{WT} (Fig. 1f). ATP depletion had no impact on XPB^{F99S}-induced chromatin decondensation while it suppressed unfolding of the array upon the tethering of the chromatin remodeler DDB2 used as control (Supplementary Fig. 1d)¹⁹. Altogether, these observations demonstrate that prolonged binding of the XPB^{320–782} or XPB^{F99S} mutants to chromatin triggers large-scale chromatin decondensation that is independent of ATP.

The XP/CS mutation increases deposition of H3K9ac mark. Thus far our results indicate that the XP/CS mutation localized in

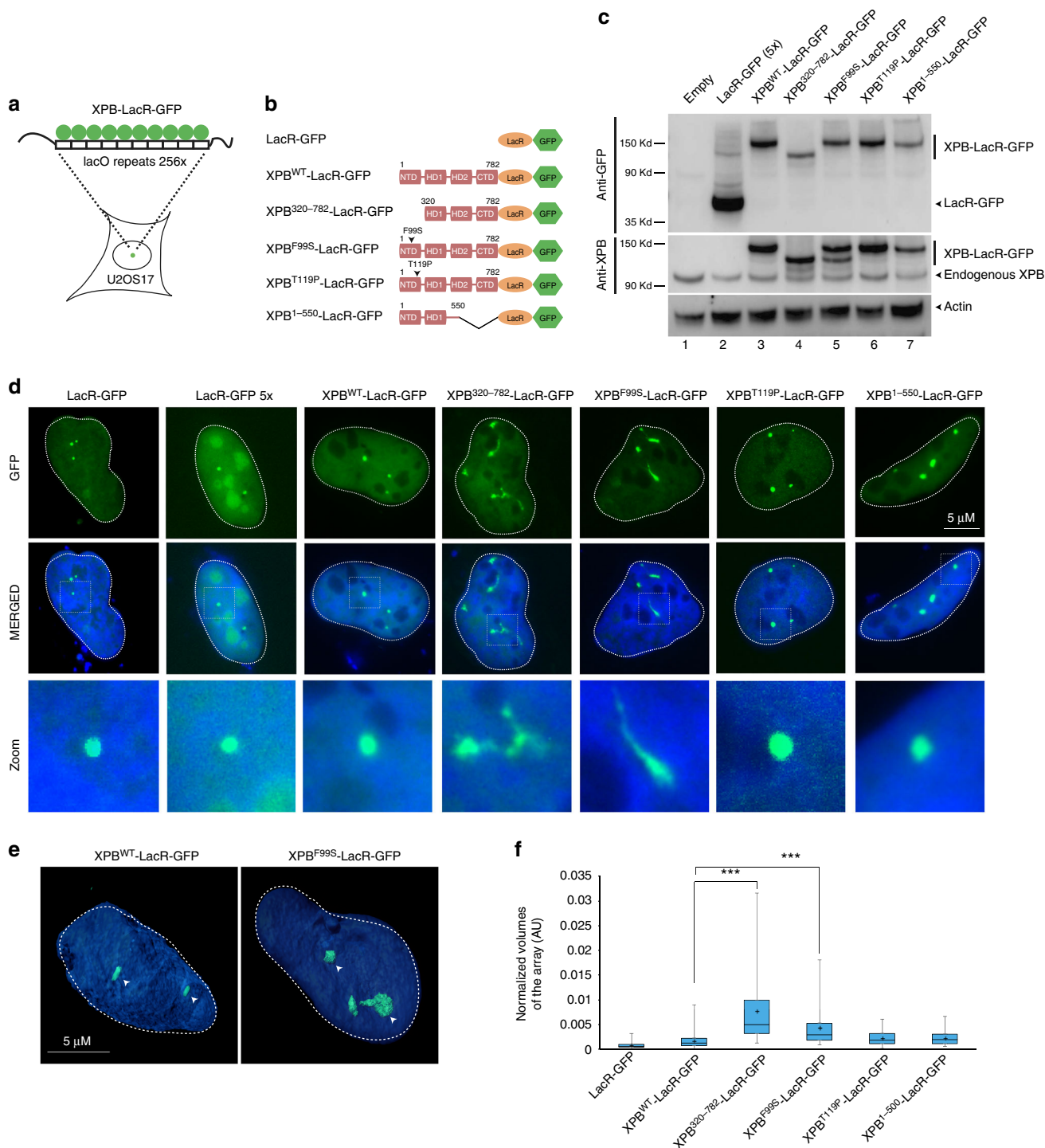
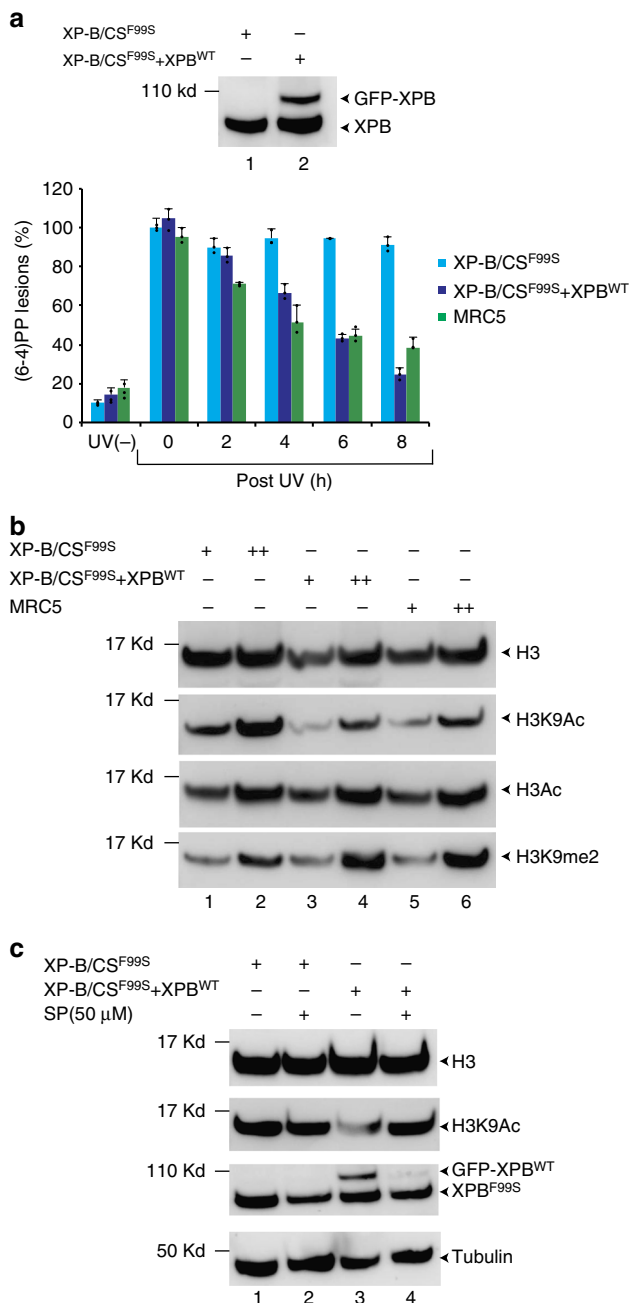


Fig. 1 A loss of XPB NTD integrity induces large-scale chromatin decondensation. **a** Schematic representation of the lacO/LacR tethering system used in U2OS17 cells. See the Materials and methods section for a full description of the cell line. **b** Schematic representation of wild-type and mutant XPB-LacR-GFP constructs. For clarity, the sizes of the GFP (238 aa) and LacR (367 aa) are omitted. **c** Proteins from whole-cell extracts (15 μg) of U2OS17 cells transiently transfected with wild-type or mutant XPB-LacR-GFP constructs were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted using either polyclonal rabbit anti-GFP (upper panel), polyclonal rabbit anti-XPB (middle panel) or monoclonal mouse anti-Actin antibodies (lower panel). Source data are provided as a Source Data file. **d** U2OS17 cells were transiently transfected with 1 μg of expression vectors for the following proteins: LacR-GFP, XPB^{WT}-LacR-GFP, XPB³²⁰⁻⁷⁸²-LacR-GFP, XPB^{F99S}-LacR-GFP, XPB^{T119P}-LacR-GFP, XPB¹⁻⁵⁵⁰-LacR-GFP. In parallel, U2OS17 cell line was transiently transfected with 5 μg of expression vector for LacR-GFP. GFP was observed by fluorescence microscopy 24 h post transfection. Lower panels are magnifications of the white rectangles in the upper panels. **e** 3D reconstruction of U2OS17 cellular nuclei transiently transfected either with XPB^{WT}-LacR-GFP or with XPB^{F99S}-LacR-GFP using Imaris Software (Bitplane). **f** Whisker box plot shows quantifications of the relative array volumes (volume of the array/volume of the nucleus; 40–150 cells for each condition). Significant *p*-values are indicated (***) and were obtained using a Kruskal Wallis test. Source data are provided as a Source Data file



the XPB NTD specifically induces large-scale chromatin decondensation. We then set out to analyze the impact of this mutation in patient-derived XPCS1BA cells (XP-B/CS^{F99S})²⁰ that we compared to XPCS1BA cells expressing wild-type GFP-tagged XPB (XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT})²¹ (Fig. 2a, upper panel). To validate this cell line, we analyzed its DNA repair activity and observed that the GFP-XPB^{WT} expressing cells removed (6-4)PP lesions with kinetics similar to that of the control MRC5 wild-type fibroblasts (Fig. 2a, lower panel) indicating that XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} had regained wild-type levels of DNA repair activity. We conclude from these experiments that the exogenously expressed XPB-GFP is functional as previously demonstrated²¹.

Using these cell lines, we next analyzed several H3 modifications and observed a higher level of global H3K9ac in XP-B/CS^{F99S} cells compared to GFP-XPB^{WT} expressing cells or to wild-type MRC5 fibroblasts (Fig. 2b). In contrast, the global level of H3 acetylation was similar in the three cell lines. H3K9 residue is

Fig. 2 XP-B/CS^{F99S} patient-derived cells have a global increase in the H3K9ac histone mark. **a** Extracts from either XP-B/CS^{F99S} or XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} cells were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with a monoclonal mouse anti-XPB antibody. Source data are provided as a Source Data file. (6-4)PP removal measurements were carried out in XP-B/CS^{F99S}, stably transfected XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} and wild-type MRC5 cells harvested at different time points after UV irradiation at 30 J/m² as indicated. Cells were labeled with a monoclonal mouse anti-(6-4)PP antibody and signals were measured using a INCell 1000 analyzer (GE Healthcare). The graph represents the percentage of lesions remaining in the genome at a given time (error bars represent SD from three independent experiments). For each time point, about 20000–40000 cells were analyzed. **b** Histones were extracted from either XP-B/CS^{F99S}, XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} or wild-type MRC5 fibroblasts, resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with either polyclonal rabbit anti-histone H3, polyclonal rabbit anti-histone H3ac, monoclonal mouse anti-histone H3K9ac or polyclonal rabbit anti-histone H3K9me2. Source data are provided as a Source Data file. **c** XP-B/CS^{F99S} or XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} cells were treated 3 h with DMSO or SP (50 μM) and histones were extracted, resolved by SDS-PAGE and immunoblotted either with a polyclonal rabbit anti-histone H3 or with monoclonal mouse anti-histone H3K9ac antibodies. In parallel, cell extracts were resolved by SDS-PAGE and western blotted with either a monoclonal mouse anti-XPB or polyclonal rabbit anti-tubulin antibodies. Source data are provided as a Source Data file

either acetylated or methylated, two modifications that are mutually exclusive²². Accordingly, we observed that increased acetylation of H3K9 in XP-B/CS^{F99S} was accompanied by a decrease in H3K9 di-methylation (me2), compared to stably transfected GFP-XPB^{WT} expressing cells or wild-type fibroblasts (Fig. 2b). In contrast, the levels of several other modifications, such as H3K4me3, H3K14ac or H3S10 phosphorylation were similar (Supplementary Fig. 2).

To further confirm that re-expression of XPB^{WT} in the stably transfected cells was responsible for decreasing the level of H3K9ac, we treated cells for 3 h with Spironolactone (SP), a small molecule that induces rapid degradation of XPB^{WT}. Interestingly, XPB^{F99S} was more resistant than XPB^{WT} to SP treatment, and only the amount of XPB^{WT} decreased dramatically in XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} cells (Fig. 2c). Therefore, SP treatment quickly restored the original XP-B/CS^{F99S} context in these cells. After 3 h of SP treatment, the rapid degradation of XPB^{WT} increased the level of H3K9ac (compare lanes 3 and 4) that reached the level observed in the parental XP-B/CS^{F99S} cells (compare lanes 4 and 1, 2). All together, these data demonstrate that XPB^{F99S} impacts posttranslational modifications of histones and chromatin structure in cells derived from the XP-B/CS^{F99S} patient.

TFIIH recruits KAT2A-containing HAT complexes to chromatin.

Acetylation of H3K9 is mainly performed by the histone acetyltransferases KAT2A (GCN5) and KAT2B (PCAF)²⁴, which are mutually exclusive subunits of the hATAC or hSAGA complexes¹⁶. We used GFP-Trap[®] to immunoprecipitate exogenous GFP-tagged XPB^{WT} from nuclear extracts of XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} cells. We observed that KAT2A, SUPT7L (a subunit of hSAGA) and WDR5 (a subunit of hATAC) were pulled-down with XPB^{WT}, as well as additional subunits of the TFIIH complex (Fig. 3a). Interestingly, we did not observe co-immunoprecipitation of KAT2B (Fig. 3a), suggesting that TFIIH interacts with the hSAGA/hATAC complexes through KAT2A. To demonstrate that endogenous TFIIH interacts with KAT2A-containing complexes, we also used a CRISPR/Cas9 engineered U2OS cell line harboring endogenous homozygous XPB-fused C-terminally to GFP (U2OS^{XPB::GFP}) (Supplementary

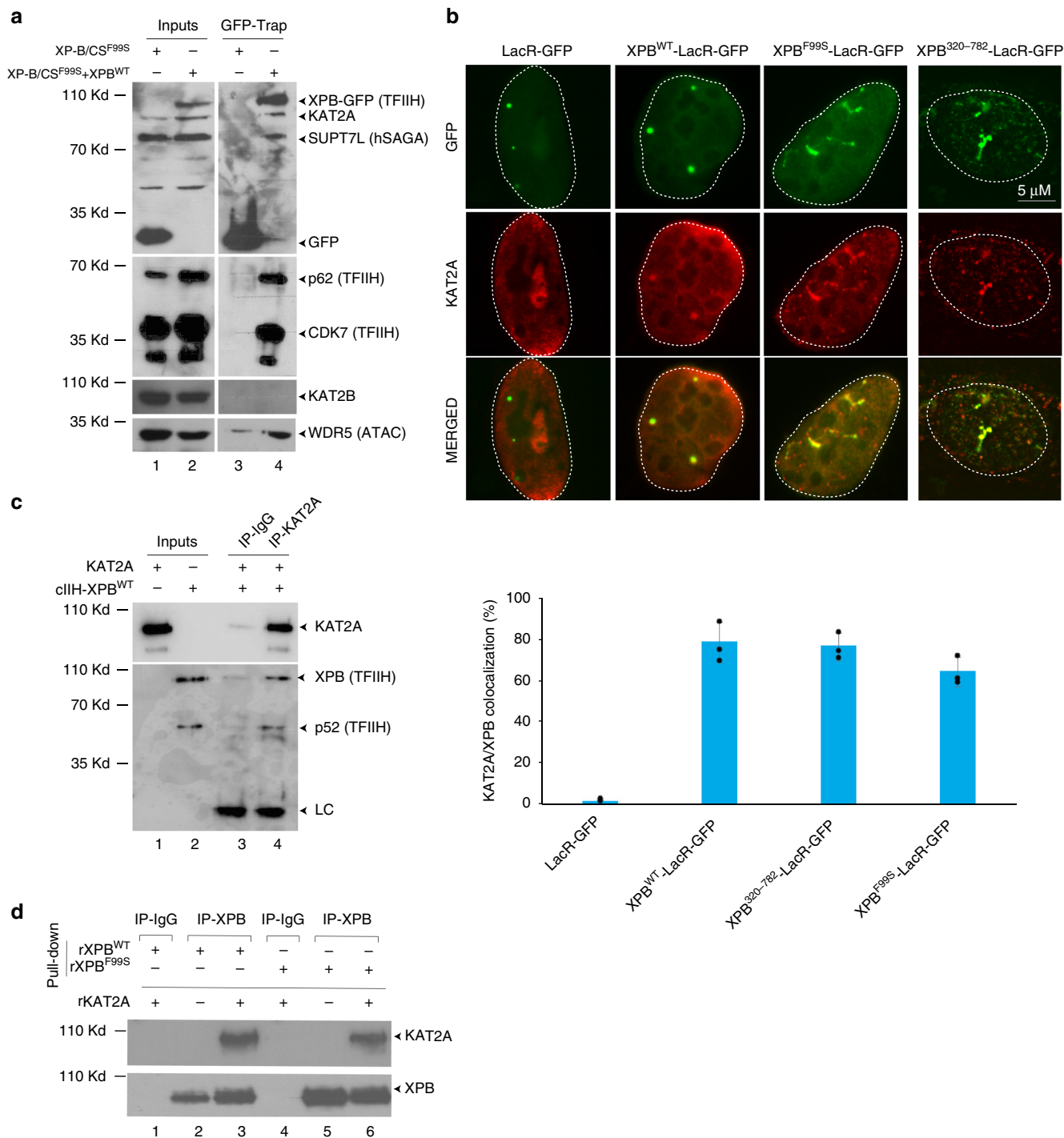


Fig. 3a). Using GFP-trap, we observed co-immunoprecipitation of KAT2A, ZZZ3 (hATAC), and SUPT7L (hSAGA) together with XPB and p44 from U2OS^{XPB::GFP} cells (Supplementary Fig. 3b).

We then co-transfected U2OS17 reporter cells with plasmids encoding Flag-KAT2A and either LacR-GFP, XPB^{WT}-LacR-GFP, XPB^{F99S}-LacR-GFP, or XPB³²⁰⁻⁷⁸²-LacR-GFP. We observed colocalization of KAT2A with the XPB^{WT} and XPB^{F99S} constructs on chromatin, which was not detected with LacR-GFP (Fig. 3b). Interestingly, KAT2A also co-localized with the NTD deletion mutant XPB³²⁰⁻⁷⁸²-LacR-GFP (Fig. 3b). In addition, we purified recombinant wild-type core TFIIH (cIIH-XPB^{WT}) expressed in insect cells¹¹ and observed direct interaction with recombinant KAT2A (rKAT2A) in vitro (Fig. 3c).

Pull-down experiments further demonstrated that rKAT2A interacts directly with both rXPB^{WT} and rXPB^{F99S} (Fig. 3d). Together, these data indicate that TFIIH interacts with both KAT2A-containing hSAGA and hATAC complexes and that F99S mutations or NTD deletion do not alter these interactions.

Loss of XPB NTD integrity increases KAT2A HAT activity. To test whether the enzymatic activity of KAT2A could be modified by TFIIH, we performed in vitro HAT assays²⁵. We incubated purified recombinant wild type or F99S core TFIIH (cIIH-XPB^{WT} or cIIH-XPB^{F99S})¹¹ (Fig. 4a, lanes 4, 5) with purified recombinant KAT2A (rKAT2A) (lane 2)²⁵ and unmodified histone H3.3 in the

Fig. 3 XPB recruits KAT2A-containing HAT complexes to chromatin. **a** TFIID-XPB^{WT} was immunoprecipitated from nuclear extracts of stably transfected cells using anti-GFP antibodies (GFP-Trap) and washed with 200 mM salt (Lanes 2 and 4). Control IPs were performed with anti-GFP on an XP-B/CS^{F99S} cell line stably expressing GFP alone (Lanes 1 and 3). Proteins on the resin were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted using polyclonal rabbit anti-GFP, monoclonal mouse anti-p62, polyclonal rabbit anti-CDK7, polyclonal rabbit anti-KAT2A (SCBT) (Supplementary Figure 9), polyclonal rabbit anti-KAT2B, polyclonal rabbit anti-WDR5, or polyclonal rabbit anti-SUPT7L antibodies. Source data are provided as a Source Data file. **b** The U2OS17 cell line was transiently transfected with 1 µg of expression vectors for the following proteins: LacR-GFP, XPB^{WT}-LacR-GFP, XPB^{F99S}-LacR-GFP, or XPB³²⁰⁻⁷⁸²-LacR-GFP together with 1 µg of expression vector for Flag-KAT2A. Colocalization of KAT2A with GFP was detected by immunofluorescence staining using a polyclonal rabbit anti-flag antibody. The values on the graph represent the percentage of colocalization of KAT2A with GFP on the array (error bars represent SD from three independent quantifications). **c** Purified wild-type recombinant core TFIID (cIIH-XPB^{WT}) was incubated with purified Flag-KAT2A (400 ng) and pull-down assays were performed using either unspecific anti-IgG or polyclonal rabbit anti-KAT2A (SCBT) antibody (Supplementary Figure 9). After washing, proteins on the resin were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted using mouse monoclonal anti-XPB or anti-p52 antibodies (two subunits of TFIID) or monoclonal mouse anti-KAT2A (IGBMC) antibody. Source data are provided as a Source Data file. **d** Bacterially expressed recombinant KAT2A (rKAT2A) (400 ng) was tested for its ability to interact with either rXPB^{WT} (lanes 1-3) or rXPB^{F99S} (lanes 4-6) (500 ng) in a pulled-down assay (IP-XPB). After washing, proteins on the resin were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted using mouse monoclonal anti-XPB and mouse monoclonal anti-KAT2A antibodies (IGBMC). Lanes 1 and 4, immunoprecipitations with an irrelevant antibody (IP-IgG). Source data are provided as a Source Data file

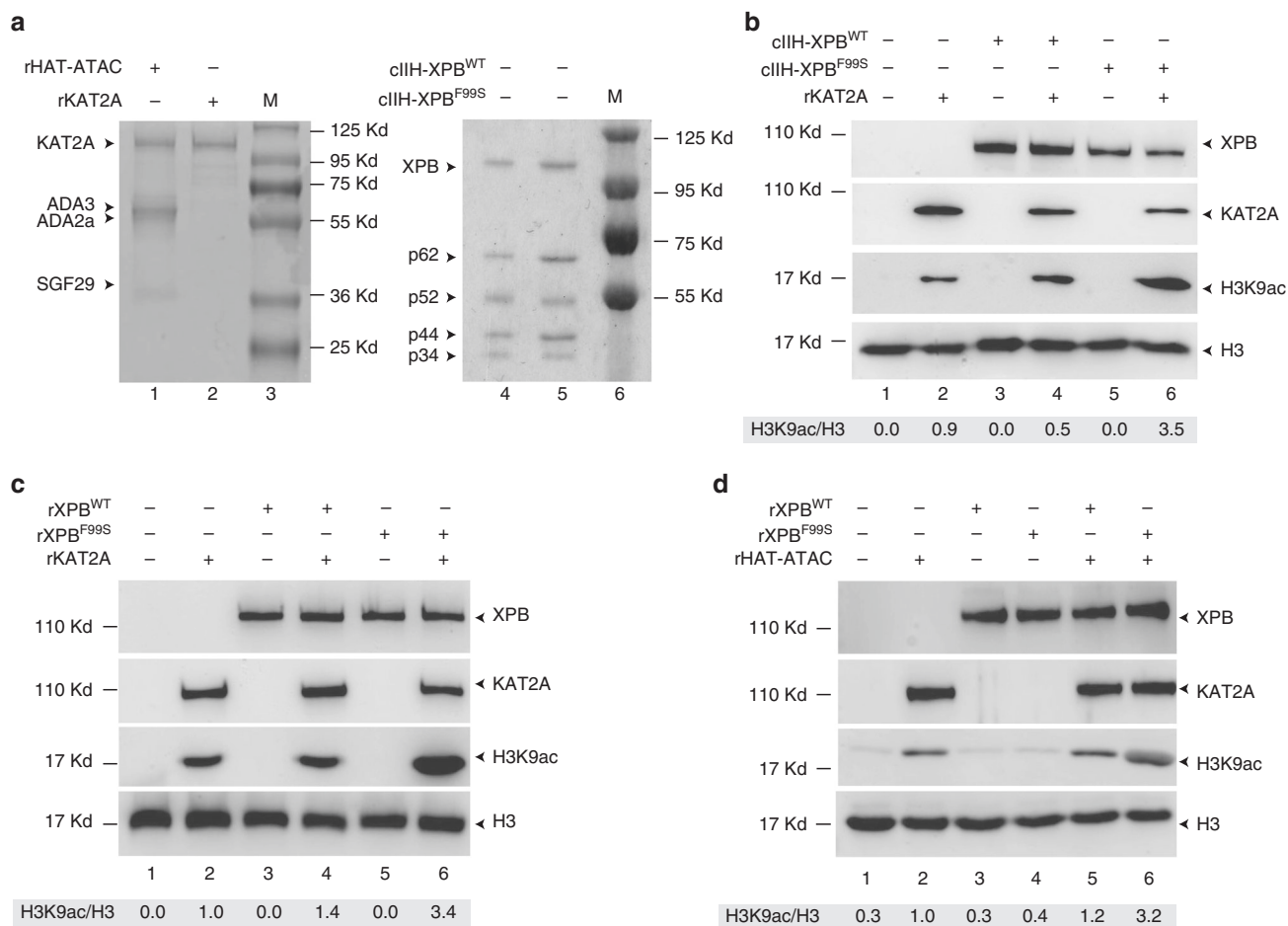


Fig. 4 Loss of XPB NTD integrity induces an increase in KAT2A HAT activity. **a** rKAT2A and the recombinant HAT-ATAC module (rHAT-ATAC) containing KAT2A, ADA3, ADA2a, and SGF29 were resolved by SDS-PAGE followed by Coomassie staining. Core TFIID containing p62, p52, p44, p34 and either XPB^{WT} (cIIH-XPB^{WT}) or XPB^{F99S} (cIIH-XPB^{F99S}) were resolved by SDS-PAGE followed by Coomassie staining. Source data are provided as a Source Data file. **b** One hundred nanograms of core TFIID containing either XPB^{WT} (cIIH-XPB^{WT}) or XPB^{F99S} (cIIH-XPB^{F99S}) were incubated with 50 ng rKAT2A together with histone H3.3 and cold acetyl-CoA. Following resolution by SDS-PAGE, proteins were immunoblotted using polyclonal rabbit anti-H3, monoclonal mouse anti-H3K9Ac, mouse monoclonal anti-XPB, and polyclonal rabbit anti-KAT2A (SCBT) antibodies. Quantification of H3K9Ac was performed using ImageJ software and normalized with H3. Source data are provided as a Source Data file. **c** Twenty nanograms of rXPB^{WT} or rXPB^{F99S} were incubated with 50 ng of rKAT2A together with histone H3.3 and cold acetyl-CoA. Following incubation, reactions were treated as described in panel (b). Source data are provided as a Source Data file. **d** Twenty nanograms of rXPB^{WT} or rXPB^{F99S} were incubated with 200 ng of the rHAT-ATAC module together with histone H3.3 and cold Acetyl-CoA. Following incubation, reactions were treated as described in panel (b). Source data are provided as a Source Data file

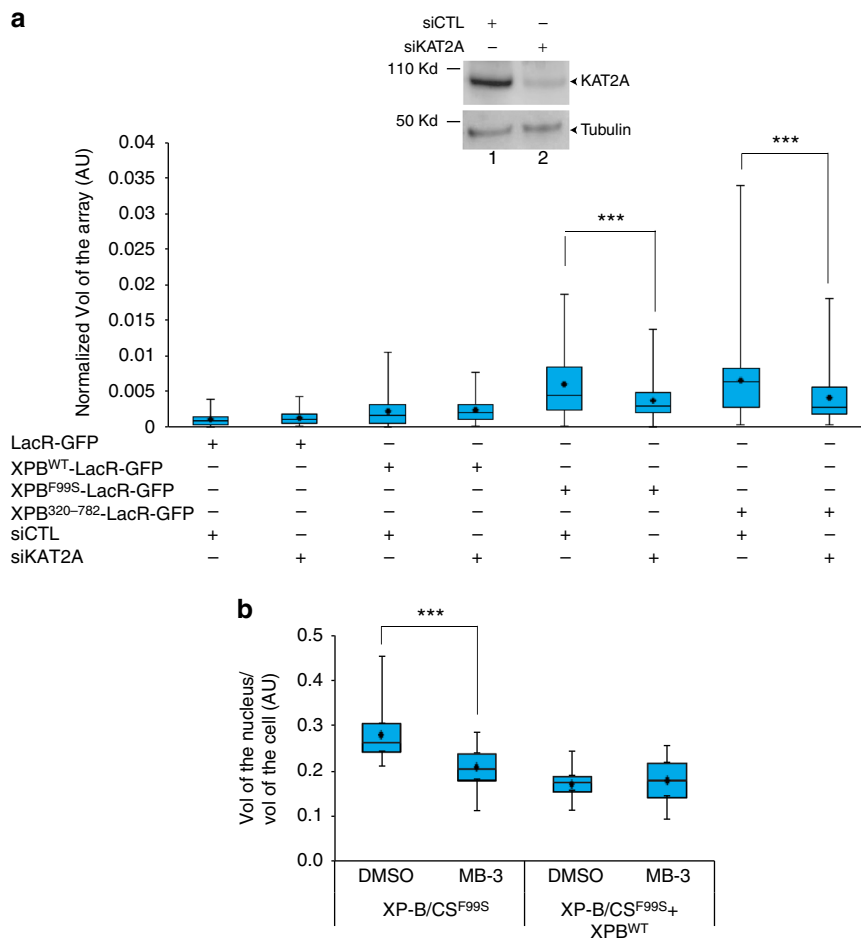


Fig. 5 Higher-order chromatin decondensation induced by XPB mutants is due to KAT2A HAT activity. **a** U2OS17 cells were transfected either with siCTL or with siKAT2A for 72 h and cell extracts were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted using polyclonal rabbit anti-KAT2A or polyclonal rabbit anti-tubulin antibodies. siCTL or siKAT2A transfected cells were re-transfected with either LacR-GFP, XPB^{WT}-LacR-GFP, XPB^{F99S}-LacR-GFP or XPB³²⁰⁻⁷⁸²-LacR-GFP for 24 h and the relative array volumes (Vol) were quantified as described above. Significant *p*-value are indicated (***) and were obtained using a Kruskal Wallis test. Source data are provided as a Source Data file. **b** XP-B/CS^{F99S} and XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} cells were treated or not with MB-3 (200 μM) for 15 h and were subsequently labeled with polyclonal rabbit anti-tubulin and stained with DAPI. Cells were then reconstructed in 3D using Imaris Software (Bitplane) and the volumes of the cells and their nuclei were measured. The whisker box plot shows the volume of the nucleus/volume (Vol) of the cell (at least 30 cells for each condition, error bars represent SD from three independent experiments). The significant *p*-value is indicated (***) and were obtained using a Kruskal Wallis test. Source data are provided as a Source Data file

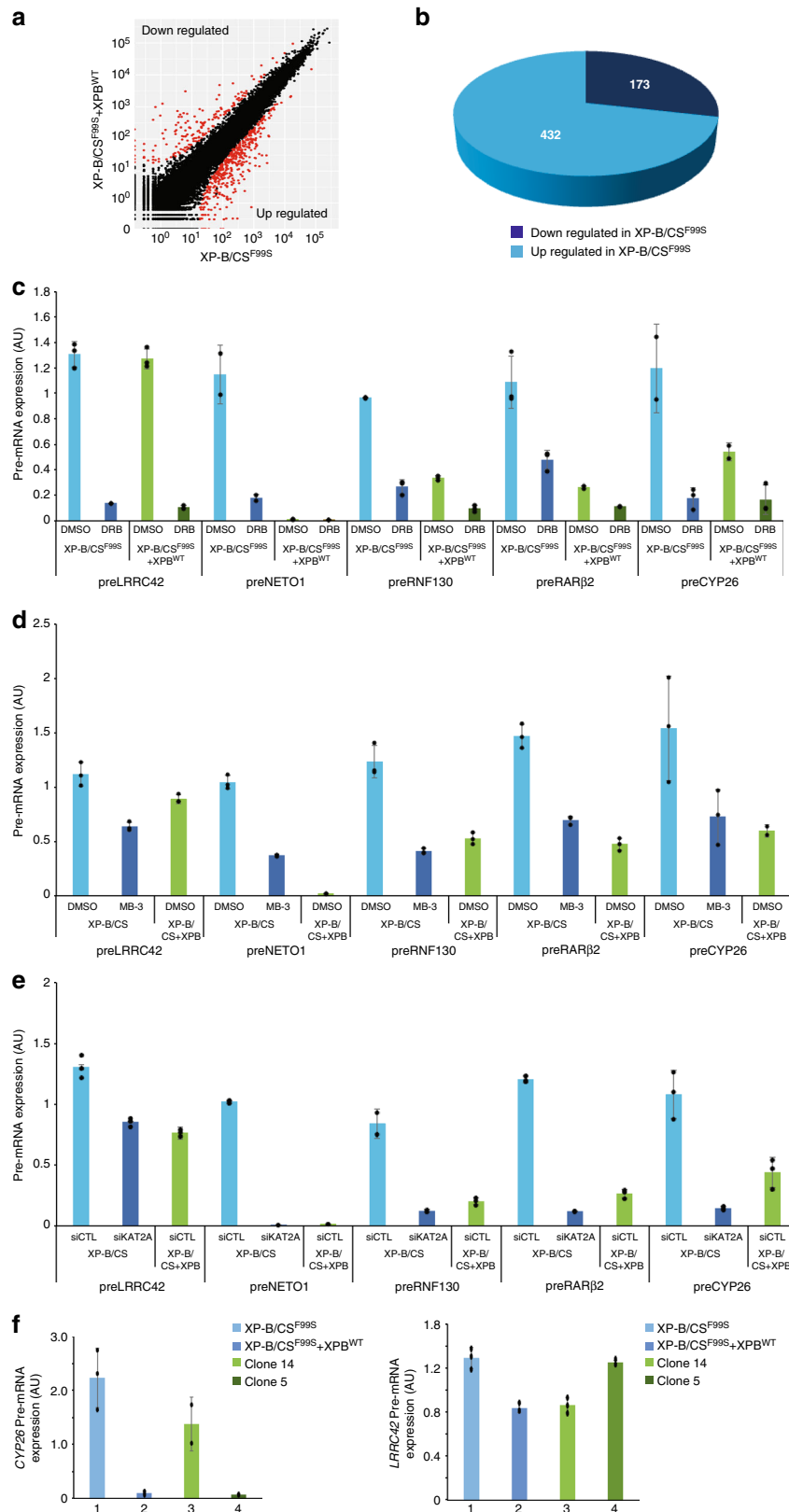
presence of cold acetyl-CoA (acetyl donor). After incubation with cIIH-XPB^{F99S}, we observed a strong increase in KAT2A HAT activity that was not detected with cIIH-XPB^{WT} (Fig. 4b). To investigate whether XPB alone is sufficient, we performed HAT assays with recombinant XPB¹¹ and demonstrated that rXPB^{F99S} increases the HAT activity of rKAT2A (Fig. 4c). To test the effect of other components of the HAT complex, we produced the recombinant human HAT module of the ATAC complex (rHAT-ATAC) that contains the KAT2A, ADA2a, ADA3, and SGF29 subunits²⁵ (Fig. 4a, lane 1) and demonstrated that rXPB^{F99S} also increases the HAT activity of the complex (Fig. 4d). We then depleted KAT2A in U2OS17 cells using small interfering (si)RNA and detected a significant decrease in chromatin decondensation induced by the tethering of XPB^{F99S} or XPB³²⁰⁻⁷⁸², whereas no modifications were detected upon tethering of XPB^{WT} (Fig. 5a).

We also tested whether chromatin decondensation in XP-B/CS^{F99S} was large enough to alter the size of the nucleus. We observed that the XPB^{F99S} mutation induces a twofold increase in the size of XP-B/CS^{F99S} nuclei compared to XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} cells (Fig. 5b). The increase in the size of the XP-B/CS^{F99S}

nucleus was reduced by the addition of inhibitor of KAT2A, MB-3 (Butyrolactone 3)²⁶, arguing that it is directly linked to KAT2A activity (Fig. 5b). Altogether, these data suggest that loss of integrity in XPB NTD induces an increase in KAT2A-containing HAT complex activity triggering large aberrant chromatin decondensation.

KAT2A induces gene activation in XP-B/CS cells. We then sought to analyze the biological significance of our findings and analyzed the transcriptomic profiles by RNA sequencing of cells derived from the XP-B/CS^{F99S} patient. We observed an increased amount of 432 mRNAs in the patient's cells, compared to stably transfected XP-B/CS + XPB^{WT} cells (Fig. 6a, b and Supplementary Data 1).

To confirm these results, we analyzed the accumulation of pre-mRNA using intron/exon junction amplification by RT-qPCR to evaluate the amount of newly synthesized mRNA. The pre-mRNA accumulation of five representative genes were studied, including *LRRC42*, whose expression was similar in the two cell lines, and *NETO1*, *RNF130*, *RARβ2*, and *CYP26*, that were



upregulated in XP-B/CS^{F99S} cells. Their pre-mRNA levels were rapidly inhibited by 1h treatment with the inhibitor of class II gene expression 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) (Fig. 6c), indicating that we had amplified pre-mRNA. While *LRRC42* pre-mRNA accumulation was similar in both cell lines, we detected a higher amount of *NETO1*, *RNF130*, *RARβ2*,

and *CYP26* pre-mRNA in DMSO-treated patient cells compared to DMSO-treated stably transfected cells (Fig. 6c), implying that these genes were more transcribed in the XP-B/CS^{F99S} patient-derived cells. When we treated the patient's cells with the inhibitor of KAT2A, MB-3 or with siKAT2A, we observed a significant repression of pre-mRNA expression for *NETO1*,

Fig. 6 KAT2A HAT activity induces inappropriate gene activation in XP-B/CS^{F99S} cells. **a** RNA-seq analysis scatter plots comparing XP-B/CS^{F99S} vs XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} transcription profiles. Points show significantly over- (bottom) or under- (top) represented mRNA in XP-B/CS^{F99S} cells compared to XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT}. All data were evaluated with the DESeq2 R package. For a given gene, its value is the normalized gene expression value relative to the mean of all samples belonging to the same condition. **b** A Comparative analysis of RNA-seq data from XP-B/CS^{F99S} and XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT}. The pie chart indicates the number of genes that are up- and downregulated in the XP-B/CS^{F99S} vs XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT}. **c** Pre-mRNA levels (error bars represent SD from three independent experiments) of *LRRC42*, *NETO1*, *RNF130*, *RARβ2*, and *CYP26* were analyzed in XP-B/CS^{F99S} or XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} cells treated with either DMSO or DRB, as indicated. Data represent the relative expression levels of the pre-mRNA vs. GAPDH mRNA. Source data are provided as a Source Data file. **d** Pre-mRNA levels (error bars represent SD from three independent experiments) of *LRRC42*, *NETO1*, *RNF130*, *RARβ2*, and *CYP26* were analyzed in XP-B/CS^{F99S} or XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} cells treated either with DMSO or with MB-3 (200 μM) as indicated. Data represent the relative expression levels of the pre-mRNA vs. GAPDH mRNA. Source data are provided as a Source Data file. **e** Pre-mRNA levels (error bars represent SD from three independent experiments) of *LRRC42*, *NETO1*, *RNF130*, *RARβ2*, and *CYP26* were analyzed in XP-B/CS^{F99S} or XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} cells treated with either siCTL or siKAT2A, as indicated. Data represent the relative expression levels of the pre-mRNA vs. GAPDH mRNA. Source data are provided as a Source Data file. **f** Pre-mRNA levels (error bars represent SD from three independent experiments) of *CYP26* and *LRRC42* were analyzed in XP-B/CS^{F99S} and XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} cells as well as on stable clone 14 and clone 5 that were selected after transfection of cDNA coding for XPB^{T119P}. Clone 14 does not express the transgene while clone 5 expresses only the transgene. Data represent the relative expression levels of the pre-mRNA vs. GAPDH mRNA. Source data are provided as a Source Data file

RNF130, *RARβ2*, and *CYP26*, which dropped to the levels observed in the stably transfected cells (Fig. 6d, e). In contrast, the expression of *LRRC42* was only moderately affected after treatment with MB-3 or siKAT2A (Fig. 6d, e).

In order to analyze whether the XPB^{F99S} mutation was responsible for the overexpression of the representative genes that we selected to study (see above), we used a model system developed by Dr. Sarasin that can be used to correlate the relative expression levels of XPB^{F99S} (XP/CS) and XPB^{T119P} (TTD) with gene expression profiles²⁷. In this system, the patient cell line XP-B/CS^{F99S} was originally transfected with a plasmid expressing XPB^{T119P} and two clones were isolated; clone 14 does not express the ectopic XPB^{T119P} and therefore only expressed the endogenous XPB^{F99S} while clone 5 only express the ectopic XPB^{T119P}²⁷. We observed a decrease in the expression of the representative *CYP26* gene with the expression of the mutant XPB^{T119P} (compare clones 14 and 5; Fig. 6f, left panel) while the expression of *LRRC42* was similar in the two clones (Fig. 6f, right panel). These data indicate, first, that XP/CS-XPB^{F99S} is responsible for the overexpression of genes observed in the patient-derived cells and, second, that the mutant TTD-XPB^{T119P}, which does not have an impact on chromatin structure (see Fig. 1), does not alter the expression of the representative genes.

Transcription repression recovery in XP-B/CS cells. We performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) in XP-B/CS^{F99S} and XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} cells and monitored the deposition of histone modification marks and the formation of the RNA Pol II transcription-initiation complex (TIC) on the promoters of the representative gene (Fig. 7a, b). In XP-B/CS^{F99S} cells, we observed a concordance between KAT2A recruitment and the deposition of the H3K9ac mark on the *RARβ2*, *RNF130*, *CYP26*, and *NETO1* promoters (Fig. 7c–f and Supplementary Fig. 4a, b). In parallel, we also performed ChIPs deposition of the H3K9ac mark on a non-coding region located 130 kb upstream of the *RARβ2* promoter (Fig. 7a)²⁸ and observed a slight increase in KAT2A recruitment and H3K9 acetylation in this region, but to a lesser extent than on the *RARβ2* promoter (Fig. 7c, e). The subsequent events, the recruitment of both the basal transcription factor TFIIB (Fig. 7g, h and Supplementary Fig. 4c) and the initiation form of RNA Pol II phosphorylated on Serine 5 (Pol II pS5) (Fig. 7i–j and Supplementary Fig. 4d) were observed on the promoters of overexpressed genes. Intriguingly, we observed that either MB-3 treatment or expression of XPB^{WT} equally led to elimination of KAT2A, decreases in the deposition of H3K9ac and eviction of TFIIB and RNA Pol II pS5 from these promoters (Fig. 7c–j and Supplementary Fig. 4a–d).

We then analyzed the recruitment of two TFIIB subunits to the overexpressed promoter models. First, we observed that the p62 subunit of the core TFIIB was recruited at these promoters only in DMSO-treated XP-B/CS^{F99S} cells (Fig. 7k, l and Supplementary Fig. 4e). Treatment with MB-3 or expression of XPB^{WT} equally led to the eviction of the core TFIIB subunit from these promoters (Fig. 7k, l and Supplementary Fig. 4e). Second, we analyzed the deposition of the XPB^{F99S} mutant in XP-B/CS^{F99S} cells. Interestingly, accumulation of XPB^{F99S} on overexpressed promoters was removed after treatment with MB-3 (Fig. 7m, n and Supplementary Fig. 4f).

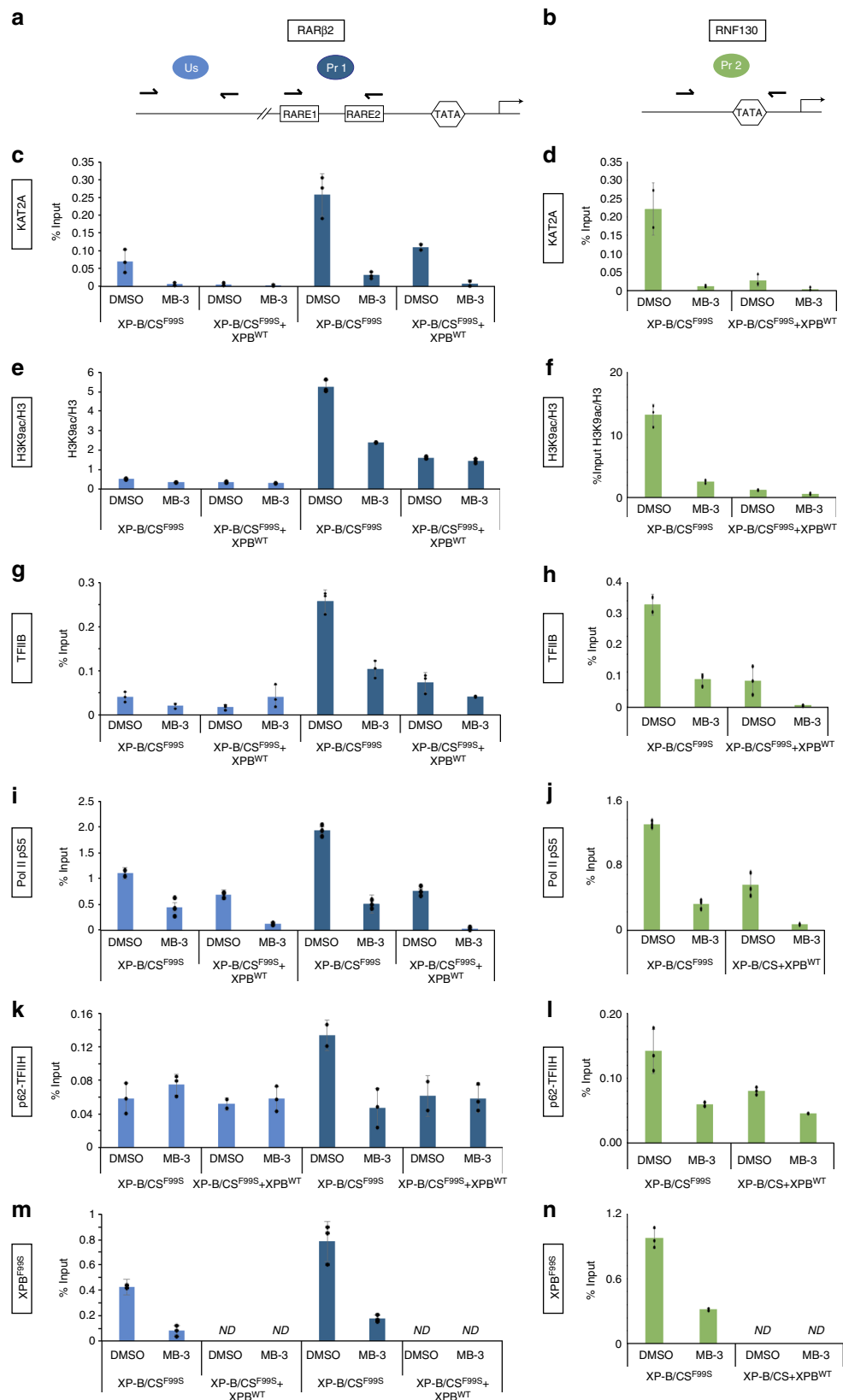
Finally, we analyzed the promoter of the *LRRC42* gene and noted a slight increase in H3K9ac in XP-B/CS^{F99S} compared to XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} cells that was sensitive to MB-3 treatment (Supplementary Fig. 5a). However, and in good agreement with the similar expression of *LRRC42* in the patient and the derived stably transfected cells, ChIP indicated a similar enrichment of TFIIB and Pol II S5 on the promoters of *LRRC42* in these cell lines, which was insensitive to MB-3 treatment or to the re-introduction of XPB^{WT} (Supplementary Fig. 5b, c).

Together, these data reveal strong recruitment of TFIIB^{F99S} and KAT2A to specific promoters in patient cells, leading to the formation of RNA Pol II TIC and gene overexpression. This cascade of events is equally sensitive to KAT2A inhibition or to rescue with XPB^{WT}.

Discussion

The findings of the current study reveal a close connection between two fundamental cellular proteins, XPB and KAT2A. A global increase in H3K9ac mark deposition, unfolding of higher level chromatin structure and deregulation of gene expression appear to be mediated through an increase in KAT2A HAT activity induced by an XP/CS mutation in XPB.

Although artificial, the lacO/LacR system provides a very fast and powerful assay for analyzing the impact of chromatin-binding factors on higher-order chromatin structure in vivo^{12,19,29,30}. However, it is often difficult to know if the proteins inducing chromatin decondensation in the lacO/LacR system are involved in large-scale chromatin remodeling in a normal environment or only in local changes to histone modifications. Robust and consistent unfolding of chromatin fibers was also observed in the A0-3 hamster reporter cell line, suggesting that XPB^{F99S} and XPB^{320–782}-mediated decondensation is a general phenomenon. In comparison, we did not detect chromatin decondensation when we tethered the acidic activation domain of the transcription activator VP16 in U2OS17 (Supplementary Fig. 6) contrary to the KAT2A-dependent large-scale



chromatin changes that it induced in A0-3¹². These observations suggest that mutated XPB induces remodeling of chromatin that differs mechanistically from local chromatin changes observed following the tethering of a transcriptional activator such as VP16.

The F99S mutation is not localized in an enzymatic domain of the protein that would modify its activity, but rather in a region previously shown to be involved in the interaction of XPB with the p52 subunit of TFIIH, its regulatory partner in the complex¹¹. The partnership between XPB and p52 results in an increase in

Fig. 7 Chromatin modification and RNA Pol II TIC formation at the promoters of overexpressed genes in XP-B/CS cells. **a, b** Schematic representations of the *RARβ2* (**a**) and *RNF130* (**b**) gene regions, including the upstream (Us) and promoter (Pr 1 and 2, respectively) regions that were amplified (see in facing half-arrowheads). **c–j** ChIPs monitoring occupancy by KAT2A (using a polyclonal rabbit anti-KAT2A antibody (EpiGenetek) Supplementary Figure 9) (**c, d**), H3K9ac/H3 (using monoclonal mouse anti-H3K9Ac and polyclonal rabbit anti-H3 antibodies) (**e, f**), TFIIB (using a polyclonal rabbit anti-TFIIB antibody) (**g, h**) and Pol II pS5 (using a monoclonal rat anti-Pol II pS5 antibody) (**i, j**) of either the Us or the Pr regions of *RARβ2* (**c, e, g, i**) or the Pr region of *RNF130* (**d, f, h, j**) in XP-B/CS^{F99S} and XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} cells treated either with DMSO or with MB-3 (200 μM). **k–n** ChIPs monitoring occupancy by the TFIIB core subunits p62 (using polyclonal rabbit anti-p62 antibody) (**k, l**) and XPB^{F99S} (using polyclonal rabbit anti-XPB antibody) (**m, n**) of the Us or Pr regions of *RARβ2* (**k–m**) or of the Pr region of *RNF130* (**l–n**) in XP-B/CS^{F99S} treated with either DMSO or MB-3

the ATPase activity of XPB, but we excluded that a modification of this activity is involved in chromatin decondensation observed here because chromatin unfolding was observed with or without cellular ATP depletion. In addition, the fact that XPB^{F99S} induces the same chromatin decondensation as the NTD deletion mutant XPB^{320–782} indicates that the cause is more likely to be related to the integrity of the NTD and deregulation of the XPB/KAT2A partnership, rather than modification of XPB activity that induces chromatin decondensation.

Mutations and transcriptional deregulation of several global genome-organizing complexes are linked to global alterations in chromatin structure and have emerged as key players in human diseases³¹. Some HAT complexes not only carry out gene-specific regulatory functions, but also exhibit global chromatin modifying functions by regulating higher chromatin organization that have an impact in human diseases²⁴. For instance, it has been shown that polyQ expansions in the hSAGA subunit ATXN7 deregulate KAT2A activity, impact chromatin condensation and result in spinocerebellar ataxia³². Our results go further and show that a mutation in a gene coding for a subunit of a basal transcription factor may also have an impact on the HAT activity of KAT2A *in trans*, leading to global alterations in chromatin structure and a human genetic disorder. The precise mechanism by which TFIIB-XPB^{F99S} increases KAT2A HAT activity is yet to be fully understood, but according to the results presented in this study, it is reasonable to postulate that TFIIB-XPB^{F99S} might trigger higher-order chromatin decondensation by prolonging the binding and recruitment of KAT2A-containing HAT complexes to chromatin. F99S could also overcome negative regulation of KAT2A by XPB NTD that occurs in normal conditions. The absence of this regulation would induce unscheduled chromatin unfolding, similar to some BRCA1 mutants²⁹.

The higher-order organization of the genome into chromatin fibers and chromosomes is well known to critically contribute to gene regulation³³. There is an increasing list of diseases in which changes to histone modifications and transcription dysregulation have been documented³¹, among which XP-B/CS can now be included.

Upregulation of gene expression could be the result of several mechanisms, including increased stability of mRNA or sequestration in the nucleus due to the cellular stress generated by a mutation that alters the rate of mRNA transcription³⁴. The upregulated genes in XP-B/CS^{F99S} cells are probably over-transcribed, because the newly synthesized pre-mRNAs are also increased. We compared our results with an earlier study in which the expression profiles of a limited number of cDNA sequences were determined in the clone 14 used in our study³⁵. We observed a strong correlation between these data, as 80% of the genes previously identified as overexpressed were also identified in our study. We confirmed these data for a few representative genes, showing that the F99S mutation is directly involved in the inappropriate gene overexpression observed in the patient cells. In our study, the level of pre-mRNA for some of these genes, such as NETO1, was almost undetectable in the stably transfected cells, indicating that they are silenced in wild-

type fibroblasts and strongly de-repressed in patient-derived fibroblasts.

Acetylated H3K9 is directly linked to the opened chromatin state that is transcriptionally permissive, while methylated H3K9 mediates gene silencing³⁶. Accordingly, there is a global increase in acetylated H3K9 in patient-derived cells while methylated H3K9 is decreased. Along the same lines, the overexpressed gene promoters and to a lesser extent the neighboring sequences have sequestered KAT2A and hyperacetylated H3K9 in XP-B/CS^{F99S} cells. Knocking down KAT2A activity resulted in a return to normal levels of expression of these promoters, together with hypoacetylation of H3K9 and decrease of TICs. Interestingly enough, knocking down KAT2A HAT activity affected H3K9ac close to the *LRRC42* promoter but hardly impaired its pre-mRNA synthesis or the recruitment of the TIC to its promoter. These data show that although the KAT2A HAT affects global chromatin structure, it only affects the expression of a specific group of genes in XP-B/CS^{F99S} patient-derived fibroblasts. This implies that global chromatin acetylation and higher-order chromatin architecture may not be the only determinants of gene regulation in cells. Thus, additional events, that need to be determined, are probably needed to increase gene expression in the decondensed chromatin of patient-derived cells.

The XPB^{F99S} mutation was found in two brothers who showed classical clinical signs of DNA repair defects, with severe sun sensitivity and freckling²⁰. There is increasing evidence that higher-order chromatin structure plays a key role in the efficiency of DNA repair³⁷. However, our previous results demonstrated that the NER defect in XP-B/CS^{F99S} cells is causally related to reduced XPB ATPase activity due to a lack of interaction between XPB^{F99S} and its regulatory TFIIB subunit p52¹¹. In line with this view, we did not observe recruitment of KAT2A to a locally UV-irradiated area of the nucleus and did not observe an impact of KAT2A knockdown on the recruitment of the DNA lesion recognition factor XPC to damaged DNA in wild-type fibroblasts (Supplementary Fig. 7).

Besides DNA repair-related phenotypes, XP-B/CS^{F99S} patients display additional clinical signs, such as a diminished stature, hearing and movement impairment, and neurological degeneration³⁸ that may be related to the deregulation of transcription. Gene ontology analysis showed that the upregulated genes in patient-derived fibroblasts belong to several fundamental cellular processes, such as development, metabolism, and response to a stimulus that may all be linked to these non-DNA repair phenotypes. Several studies have revealed that human diseases could be the result of inappropriate transcriptional activation/depression³⁹. Interestingly, the phenotypes of these diseases are tissue-specific, as are the XP-B/CS phenotypes. It therefore seems likely that some of the XP-B/CS phenotypes are caused by the overexpression of a few specific genes that are normally expressed exclusively in particular tissues, or only under certain conditions that remain to be established. Finally, we analyzed the expression of several pre-mRNAs in XP-D/CS or CS-B patient cells mutated in XPD and CSB, respectively, and found that some genes, such as *RARβ2* or *RNF130*, were also overexpressed in these cells

(Supplementary Fig. 8). These observations suggest that deregulation of the transcriptional program in XP-B/CS cells is not restricted to the F99S mutation and could be a general cellular phenotype of CS patients. In any case, the identification of the molecular defect associated with the inappropriate expression of genes in XP and CS patients may pave the way for new treatments that are based on drugs targeting transcription overexpression and that will relieve some of their symptoms.

Methods

Cell lines and reagents. The A0-3 cell line was cultured in DMEM/HAMF12 supplemented with 5% FCS and penicillin 100 UI/ml and streptomycin 100 µg/ml. The U2OS17 cell line was cultured in DMEM (4.5 g/l Glucose) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and Gentamycin (40 µg/ml). The U2OS17 stable cell line is one of the clones generated by the team of Dr. Soutoglou^{13,17,18}. Briefly, U2OS cells were transfected with a plasmid that contains an I-SceI recognition site flanked by 256 copies of the lac operator (lacO) on one side and by 96 copies of the tetracycline response element on the other side (tetO). There are two insertions of LacO repeats in the U2OS17 cells, and consequently the following number of spots that can be observed depends on the cell cycle stage: two spots in G1, four spots in G2, three spots in the middle of S phase. Note also that in some cases the two spots are very closed to each other.

Stable U2OS17 cells expressing lacR fusion proteins were produced as follows. U2OS17 cells were stably transfected with pEGFP-LacR-XPB^{WT} or pEGFP-LacR-XPB^{F99S} and selected with G418 500 µg/ml and Hygromycin B 200 µg/ml. Clones were selected and cultured in DMEM (4.5 g/l glucose) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), Gentamycin (40 mg/ml), IPTG 5 mM, G418 500 µg/ml, and Hygromycin B 200 µg/ml.

XP-B/CS^{F99S} cells (XPCS1BA-SV40)²⁰ expressing *ERCC3* c.296T>C mutant, pPhe99Ser (RefSeq accession number [NM_000122.1](#)) and the stably transfected XP-B/CS^{F99S} + XPB^{WT} cells are SV40-transformed human fibroblasts that were cultured in DMEM/HAMF10 supplemented with 10% FCS.

Clones 5 and 14 are XPCS1BA-SV40 cells that were stably transfected with a vector that expresses *ERCC3* c.355A>C, pThr119P mutant²⁷. Clone 5 expresses only the XPB^{T119P} mutant and clone 14 only XPB^{F99S}.

XP-D/CS^{G602D} cells (XPCS2)⁴⁰ are human primary fibroblasts that express *ERCC2* c.1805G>A mutation (RefSeq [NM_000400.3](#)).

CS-B cells (CS1ANSV)⁴¹ are SV40-transformed human fibroblasts that express CSB c.1088A>T mutation (RefSeq [NM_001277058.1](#)).

All these cells were cultured in DMEM/HamF10 (1:1) medium containing 10% FCS and 40 mg/ml gentamycin at 37 °C in a 5% CO₂ incubator.

A complete list of reagents, oligonucleotides, siRNA, plasmids, and chemicals used in this manuscript is available in Supplementary Table 1.

CRISPR/Cas9 engineered U2OS^{XPB::GFP} cells. U2OS^{XPB::GFP} cells expressing XPB-GFP from the XPB locus were prepared by genome editing with the CRISPR-Cas9 system, as follows. A guide RNA sequence targeting cleavage next to the STOP codon of the XPB gene was cloned into the pMLM3636 expression plasmid (targeted sequence, with guide RNA spacer sequence in uppercase and PAM in lowercase 5'AGGAAATGATGCTTAGCCAGggg3'). A donor plasmid was constructed with eGFP-2A-puromycin coding sequences inserted at the position of the XPB STOP codon and flanked by the 5' homology arm chr2:127257599-127257872 (hg38) and 3' homology arm chr2:127257596-127256813 (hg38). Guide RNA, Cas9 and donor plasmids were electroporated into U2OS cells using the Amaxa nucleofactor II with kit V and program X-001 (Amaxa, Lonza, Switzerland). Clones of cells expressing XPB-GFP-2A-puromycin were selected with puromycin and targeted insertion was confirmed by PCR amplification of the expected junction fragments. A clone that expresses XPB-GFP but no longer expresses XPB (due to the modification of all XPB gene alleles) was used for further experiments. U2OS cells were purchased from ATCC and checked for the absence of mycoplasma contamination.

Constructs. Full-length XPB coding sequence was amplified and ligated into the EcoRI/BamHI restriction sites of the pEGFP-N1 vector (Clontech) giving the pEGFP-XPB construct. To generate fusions between LacR, XPB, and GFP, the cDNA of LacR was amplified by PCR and cloned in pEGFP-XPB vector between GFP and XPB. The FLAG-KAT2A-expressing construct was described in⁴².

Immunofluorescence and 3D reconstructions. Staining was done following a standard IF protocol. Briefly, cells were washed with PBS, fixed in freshly prepared 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min at RT and permeabilized with PBS 0.1% Triton X-100 for 3 × 5 min at RT. Blocking (RT, 20 min) and incubations with antibodies (RT, 1 h) were performed with 10% heat-inactivated FCS in PBS 0.1% Triton X-100 and washes were done with PBS 0.1% Triton X-100 at RT for 3 × 5 min. Nuclei were counterstained with freshly prepared 1 µg/mL DAPI in PBS for 2 min at RT and cells were mounted using the ProLong Gold antifade reagent of Molecular Probes. Confocal microscopy pictures were taken with a Leica SP2

microscope; Z stack width was usually 0.5 µm. For counting colocalised signals, at least 100 cells were analyzed for each condition. For 3D reconstructions, stacks were captured using a Leica DM6000 microscope with a Leica CSU22 spinning disc and an Andor Ixon 897 camera, the step size was 0.2 µm. For reconstruction of the images and the quantification of the volume filled by the signal, Imaris Software (Bitplane) was used. Results are shown in box and whisker plots. *p*-values represent significant differences based on a Kruskal–Wallis test.

Immunofluorescent-based DNA lesion quantification. Five thousand cells were plated in 96-well plates (OptiPlates-96, Perkin Elmer). 24 h later, cells were UV-irradiated with a UV-C lamp (30 J/m²) for the indicated period of time at 37 °C, 5% CO₂ and recovered in fresh medium. Immuno-labeling of (6-4)PP was performed using the mouse 64M-2 antibody following the IF protocol. A step of DNA denaturation was added after permeabilization where cells were treated with freshly prepared 2M HCl for 30 min at RT. Cells were washed with PBS for 5 min and blocked. (6-4)PP lesions were quantified using an IN Cell Analyser 1000 imaging system (GE Healthcare) and the amount of (6-4)PP removal was determined.

Cell extract and western blot. Cells were scraped in PBS on ice, lysed in RIPA buffer 10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 140 mM NaCl for 30 min at 4 °C and centrifuged at 18 kg for 20 min at 4 °C. Fifteen micrograms of each extract was loaded on an SDS-PAGE gel.

Purification of rKAT2A and the rHAT-ATAC module. Recombinant FLAG tagged KAT2A was purified using anti-FLAG M2-agarose beads (Sigma). M2-agarose-bound protein complexes were washed three times with immunoprecipitation (IP) buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.9, 10% (v/v) glycerol, 0.1% Nonidet P-40, 0.5 mM DTT, 5 mM MgCl₂) containing 0.5 M KCl and twice with IP buffer containing 100 mM KCl. After washing, proteins were eluted with a 1000 × excess of the flag epitope peptide. The reconstituted human HAT module of the ATAC complex (rHAT-ATAC) containing the KAT2A, ADA2a, ADA3, and SGF29 subunits was expressed and purified from insect cells²⁵.

Histone acetyltransferase assay. The HAT activity of rKAT2A or rHAT-ATAC was measured using histone acetyltransferase assay²⁵. Recombinant histones H3.3 were incubated with rKAT2A or the rHAT-ATAC module in the presence of acetyl-CoA in HAT buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 7% glycerol, 25 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT) for 1 h at 30 °C. The reaction was then analyzed by western blotting with specific antibodies (H3 and H3K9ac).

Pull-down assay. XPB was expressed in baculovirus and incubated for 4 h at 4 °C with anti-XPB covered beads in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 20% glycerol, 0.1% NP40). Following three washes with lysis buffer, beads were further incubated at 4 °C for 1 h with 500 ng of purified Flag-KAT2A in lysis buffer. Pull downs were washed with RIPA buffer and analyzed by western blotting.

Reverse transcription and real-time quantitative PCR. Total RNA was isolated using TRI REAGENT (MRC) and purified by phenol-chloroform extraction. RNA was reverse transcribed with SuperScript IV reverse transcriptase (Invitrogen) and Oligo d(T). Quantitative PCR was done using the SYBR Green Master Mix in a Lightcycler 480 (Roche). mRNA levels were normalized against the housekeeping *GAPDH* mRNA. Sequences of primers are available in Supplementary Table 1.

RNA-seq analysis. Total RNAs from XP-B/CS and XP-B/CS + XPB^{WT} cells were extracted using GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma). Libraries were prepared with TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit following guide instructions and subsequently analyzed on an Illumina HiSeq 4000 as single-end 50 base reads following Illumina's instructions. Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Reads were mapped onto the hg19 assembly of the human genome. Read counting was performed with HOMER v4.8.3(65) and expression was estimated with EdgeR. Genome ontology was performed with The Database for Annotation and Integrated Discovery (DAVID) v6.7 (<https://david.ncifcrf.gov>).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). Cells were cross-linked at room-temperature (RT) for 10 min with 1% formaldehyde. Chromatin was prepared and sonicated on ice for 30 min using a sonicator (Q800R; Qsonica)²⁸. Protein G Sepharose beads (Upstate) were prepared by incubation with antibodies at 4 °C for 2 h and incubated with samples at 4 °C overnight. After washing, protein-DNA complexes were eluted and decrosslinked. DNA fragments were purified using Qiaquick PCR purification Kits (QIAGEN) and analyzed by qPCR using the set of primers indicated in Supplementary Table 1.

siRNA. The ON-TARGET plus smart pool siRNA control or human KAT2A targeting siRNAs were purchased from Dharmacon and transfected at a final

concentration of 100 nM using the Lipofectamine RNAiMax reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol.

Quantification and statistical analysis. Statistical analysis of experimental data was performed using a Student's paired *t* test for CHIP and RT-PCR, and a Kruskal–Wallis test for 3D reconstruction analysis. Results are presented as mean \pm standard deviation (SD). *p*-values are shown.

Reporting Summary. Further information on experimental design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request. The RNA-seq data reported in this paper is accessible at the GEO under accession code [GSE125963](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE125963).

Received: 28 May 2018 Accepted: 1 March 2019

Published online: 20 March 2019

References

- Compe, E. & Egly, J. M. Nucleotide excision repair and transcriptional regulation: TFIIF and beyond. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 265–290 (2016).
- Lehmann, A. R. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* **85**, 1101–1111 (2003).
- Giglia-Mari, G. et al. A new, tenth subunit of TFIIF is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat. Genet.* **36**, 714–719 (2004).
- Oh, K. S. et al. Phenotypic heterogeneity in the XPB DNA helicase gene (ERCC3): xeroderma pigmentosum without and with Cockayne syndrome. *Hum. Mutat.* **11**, 1092–1103 (2006).
- Compe, E. & Egly, J. M. TFIIF: when transcription met DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 343–354 (2012).
- Balasingham, S. V. et al. Enzymatic activities and DNA substrate specificity of Mycobacterium tuberculosis DNA helicase XPB. *PLoS ONE* **7**, e36960 (2012).
- Biswas, T., Pero, J. M., Joseph, C. G. & Tsodikov, O. V. DNA-dependent ATPase activity of bacterial XPB helicases. *Biochemistry* **48**, 2839–2848 (2009).
- Poterszman, A. et al. Expression in *Escherichia coli*: purification and characterization of cyclin H, a subunit of the human general transcription/DNA repair factor TFIIF. *Protein Expr. Purif.* **9**, 153–158 (1997).
- Rouillon, C. & White, M. F. The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins. *Res. Microbiol.* **162**, 19–26 (2011).
- Weeda, G. et al. Molecular cloning and biological characterization of the human excision repair gene ERCC3. *Mol. Cell Biol.* **10**, 2570–2581 (1990).
- Coin, F., Oksenyk, V. & Egly, J. M. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIF in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol. Cell* **26**, 245–256 (2007).
- Tumbar, T., Sudlow, G. & Belmont, A. S. Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *J. Cell Biol.* **145**, 1341–1354 (1999).
- Ziani, S. et al. Sequential and ordered assembly of a large DNA repair complex on undamaged chromatin. *J. Cell Biol.* **206**, 589–598 (2014).
- Koutelou, E., Hirsch, C. L. & Dent, S. Y. Multiple faces of the SAGA complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 374–382 (2010).
- Samara, N. L. & Wolberger, C. A new chapter in the transcription SAGA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 767–774 (2011).
- Spedale, G., Timmers, H. T. & Pijnappel, W. W. ATAC-king the complexity of SAGA during evolution. *Genes & Dev.* **26**, 527–541 (2012).
- Lemaitre, C. et al. The nucleoporin 153, a novel factor in double-strand break repair and DNA damage response. *Oncogene* **31**, 4803–4809 (2012).
- Nagy, Z. et al. Tankyrases promote homologous recombination and check point activation in response to DSBs. *PLoS Genet.* **12**, e1005791 (2016).
- Luijsterburg, M. S. et al. DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *J. Cell Biol.* **197**, 267–281 (2012).
- Vermeulen, W. et al. Clinical heterogeneity within xeroderma pigmentosum associated with mutations in the DNA repair and transcription gene ERCC3. *Am. J. Hum. Genet.* **54**, 191–200 (1994).
- Hoogstraten, D. et al. Rapid switching of TFIIF between RNA polymerase I and II transcription and DNA repair in vivo. *Mol. Cell* **10**, 1163–1174 (2002).
- Wang, Z. et al. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat. Genet.* **40**, 897–903 (2008).
- Alekseev, S. et al. A small molecule screen identifies an inhibitor of DNA repair inducing the degradation of TFIIF and the chemosensitization of tumor cells to platinum. *Chem. Biol.* **21**, 398–407 (2014).
- Nagy, Z. & Tora, L. Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* **26**, 5341–5357 (2007).
- Riss, A. et al. Subunits of ADA-two-A-containing (ATAC) or Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase (SAGA) coactivator complexes enhance the acetyltransferase activity of GCN5. *J. Biol. Chem.* **290**, 28997–29009 (2015).
- Biel, M., Kretsovali, A., Karatzali, E., Papamatheakis, J. & Giannis, A. Design, synthesis, and biological evaluation of a small-molecule inhibitor of the histone acetyltransferase Gcn5. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**, 3974–3976 (2004).
- Riou, L. et al. The relative expression of mutated XPB genes results in xeroderma pigmentosum/Cockayne's syndrome or trichothiodystrophy cellular phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1125–1133 (1999).
- Le May, N. et al. NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. *Mol. Cell* **38**, 54–66 (2010).
- Ye, Q. et al. BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations. *J. Cell Biol.* **155**, 911–921 (2001).
- Ahanger, S. H. et al. Ectopically tethered CP190 induces large-scale chromatin decondensation. *Sci. Rep.* **4**, 3917 (2014).
- Misteli, T. Higher-order genome organization in human disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000794 (2010).
- Helmlinger, D. et al. Glutamine-expanded ataxin-7 alters TFC/STAGA recruitment and chromatin structure leading to photoreceptor dysfunction. *PLoS Biol.* **4**, e67 (2006).
- Fraser, P. & Bickmore, W. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* **447**, 413–417 (2007).
- de Nadal, E., Ammerer, G. & Posas, F. Controlling gene expression in response to stress. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 833–845 (2011).
- da Costa, R. M., Riou, L., Paquola, A., Menck, C. F. & Sarasin, A. Transcriptional profiles of unirradiated or UV-irradiated human cells expressing either the cancer-prone XPB/CS allele or the noncancer-prone XPB/TTD allele. *Oncogene* **24**, 1359–1374 (2005).
- Eberharter, A. & Becker, P. B. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* **3**, 224–229 (2002).
- Misteli, T. & Soutoglou, E. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 243–254 (2009).
- Scott, R. J. et al. Xeroderma pigmentosum-Cockayne syndrome complex in two, new patient: absence of skin tumors despite severe deficiency of DNA excision repair. *J. Am. Acad. Genet.* **29**, 883–889 (1993).
- Gabellini, D., Tupler, R. & Green, M. R. Transcriptional derepression as a cause of genetic diseases. *Curr. Opin. Genet. & Dev.* **13**, 239–245 (2003).
- Takayama, K. et al. Defects in the DNA repair and transcription gene ERCC2 (XPD) in trichothiodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **58**, 263–270 (1996).
- Mayne, L. V., Priestley, A., James, M. R. & Burke, J. F. Efficient immortalization and morphological transformation of human fibroblasts by transfection with SV40 DNA linked to a dominant marker. *Exp. Cell Res.* **162**, 530–538 (1986).
- Demeny, M. A. et al. Identification of a small TAF complex and its role in the assembly of TAF-containing complexes. *PLoS ONE* **2**, e316 (2007).

Acknowledgements

We thank Dr. Bohdan Wasyluk for proofreading and Simon Pichard for technical assistance. We thank Dr. E. Soutoglou (IGBMC, France) and Dr. A. Belmont (University of Illinois, USA) for the U2OS17 cells and for the A0-3 cells, respectively. We thank Dr. K.J. Jung and G. Church for the pMLM3636 and hCas9 expression plasmids, respectively. J.S. was supported by a PhD fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale. G.C. was supported by a PhD fellowship (2214-A) from the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK). This study was supported by the ANR (FRET-NET and START), INCA (2017-147, 2015-142) (F.C., A.P.), the Fondation ARC (Projet Fondation ARC 2019, F.C.) and ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02, and was also supported by the European Research Council (ERC) Advanced grant (ERC-2013-340551, Birtoaction, to L.T.). Sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, a member of the "France Génomique" consortium (ANR-10-INBS-0009).

Author contributions

J.S. performed microscopy, chromatin modification and transcriptional analysis. Z.N. performed microscopy analysis. P.C. performed immunoprecipitation, and GST pull-down assays. G.C. and L.T. expressed and purified the ATAC complex. G.S., J.B.R., J.P.C. and A.P. designed, produced and tested the CRISPR/Cas9 U2OS cell line. N.L. performed transcriptional and HAT assays. L.T., J.M.E. and N.L.M. analyzed data. F.C. designed the experiments, analyzed data, and wrote the manuscript with inputs from each co-author.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09270-2>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Journal peer review information: *Nature Communications* thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

**Functional interplay between TFIIH and KAT2A regulates higher-order
chromatin structure and class II gene expression**

Jérémy Sandoz^{1,2,3,4}, **Zita Nagy**^{1,2,3,4}, **Philippe Catez**^{1,2,3,4}, **Gizem Caliskan**^{1,2,3,4}, **Sylvain Geny**⁵, **Jean-Baptiste Renaud**⁵, **Jean-Paul Concordet**⁵, **Arnaud Poterszman**^{1,2,3,4}, **Laszlo Tora**^{1,2,3,4}, **Jean-Marc Egly**^{1,2,3,4}, **Nicolas Le May**^{1,2,3,4} and **Frédéric Coin**^{1,2,3,4,6}

¹ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire Illkirch Cedex, C.U. Strasbourg, France

² Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, 67404 Illkirch, France

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1258, 67404 Illkirch, France

⁴ Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France

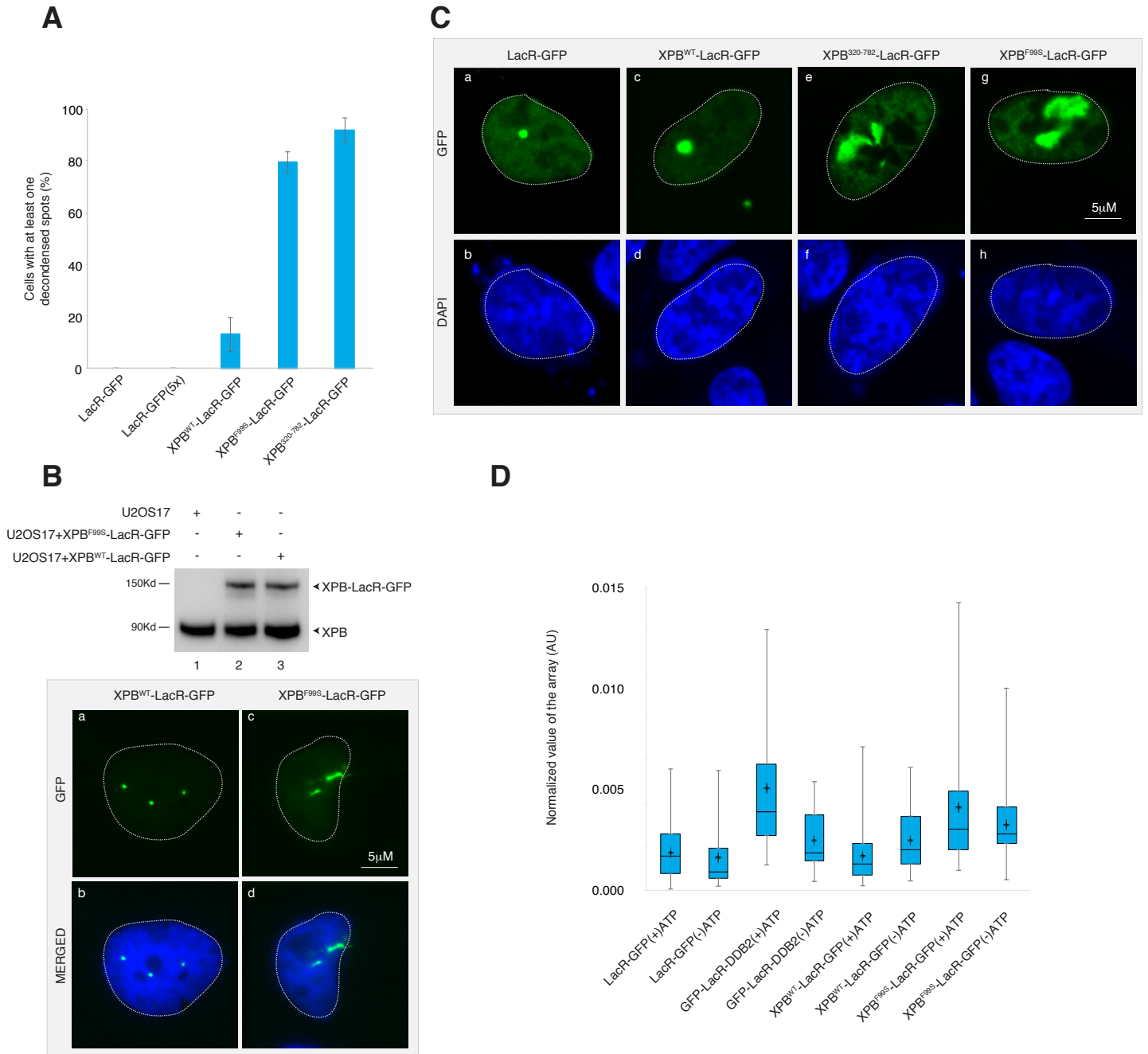
⁵ Laboratoire Structure et Instabilité des Génomes, INSERM U1154, CNRS UMR7196, Muséum national d'Histoire naturelle, 43 rue Cuvier, 75005 Paris, France

⁶ Corresponding author, fredr@igbmc.fr

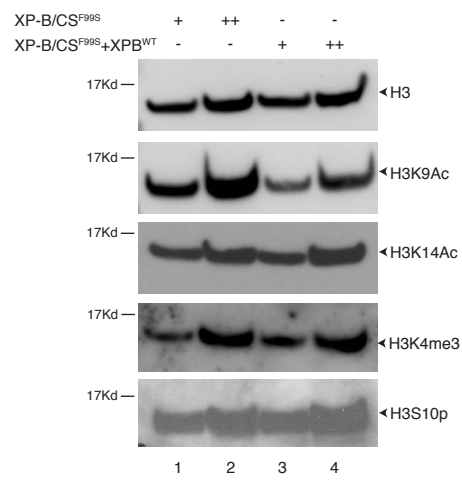
Tel: +33 3 88 65 34 49

Supplementary Data

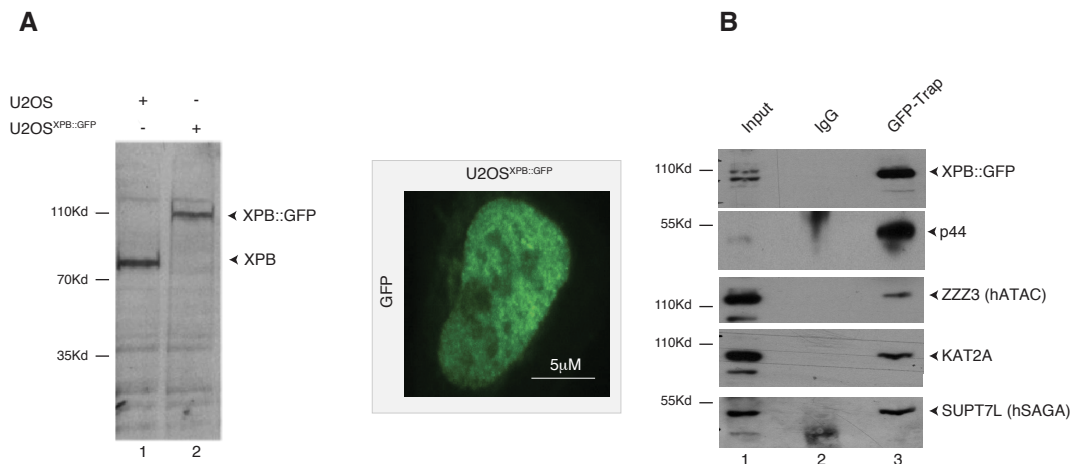
Supplementary Data includes 8 Supplementary Data files (Figure 1 to 8) and 1 Supplementary Table (Table 1):



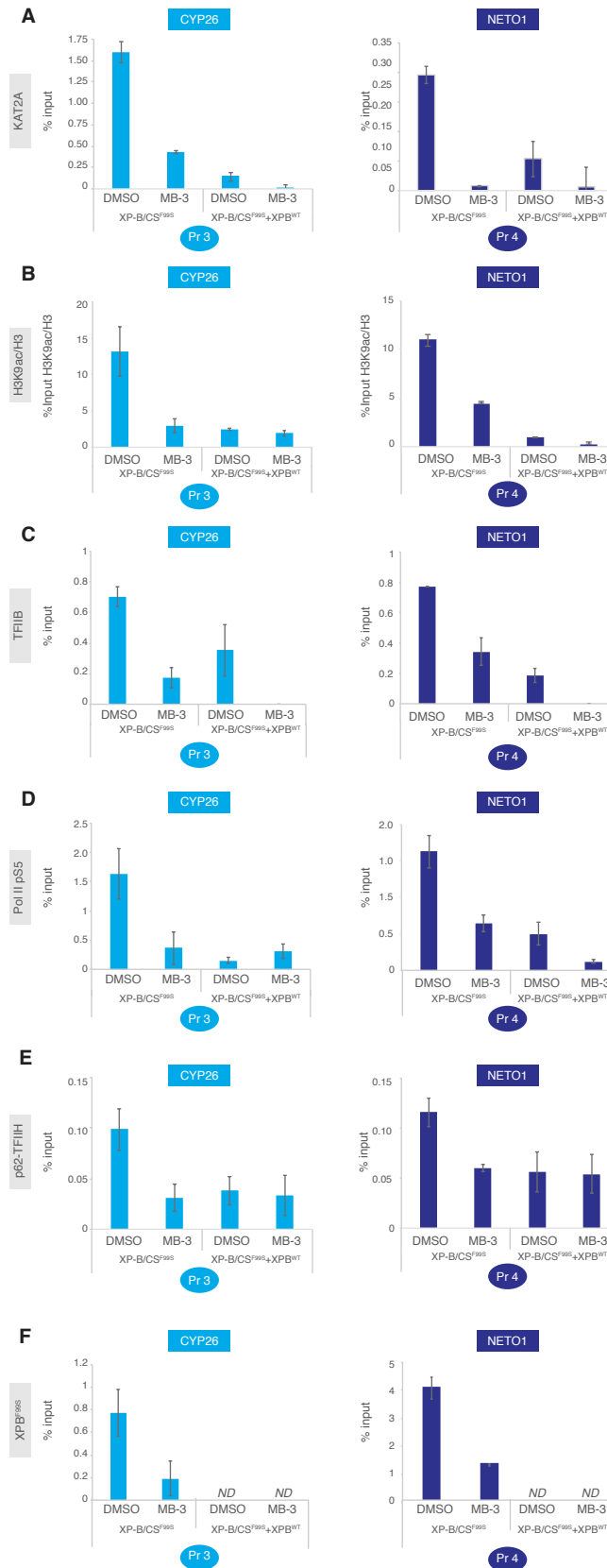
Supplementary Figure 1. (A). Quantification of the percentage of cells with at least one decondensed array after tethering of the indicated fusion proteins. Values represent the mean of two independent experiments ($n=50$ cells). **(B). Upper panel;** Stable U2OS17 cells expressing either XPB^{WT}-LacR-GFP or XPB^{F99S}-LacR-GFP were established and total cell extracts were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with mouse-monoclonal anti-XPB. **Lower panel;** In stable U2OS17 cells expressing XPB^{WT}-LacR-GFP (a-b) or XPB^{F99S}-LacR-GFP (c-d), GFP was detected by fluorescence microscopy and cells were stained with DAPI. **(C).** LacR-GFP (a-b), XPB^{WT}-LacR-GFP (c-d), XPB³²⁰⁻⁷⁸²-LacR-GFP (e-f) and XPB^{F99S}-LacR-GFP (g-h) were transfected in hamster A0-3 cells and tethered to chromatin. GFP was detected by fluorescence microscopy 24 hrs post transfection. **(D).** LacR-GFP, GFP-LacR-DDB2, XPB^{WT}-LacR-GFP or XPB^{F99S}-LacR-GFP were transfected in U2OS17 cells incubated in medium with or without inhibitor of ATP synthesis. The Whisker box plot represents the quantifications of the relative array volumes (volume of the array/volume of the nucleus; 500 cells for each condition; normalized value of the array).



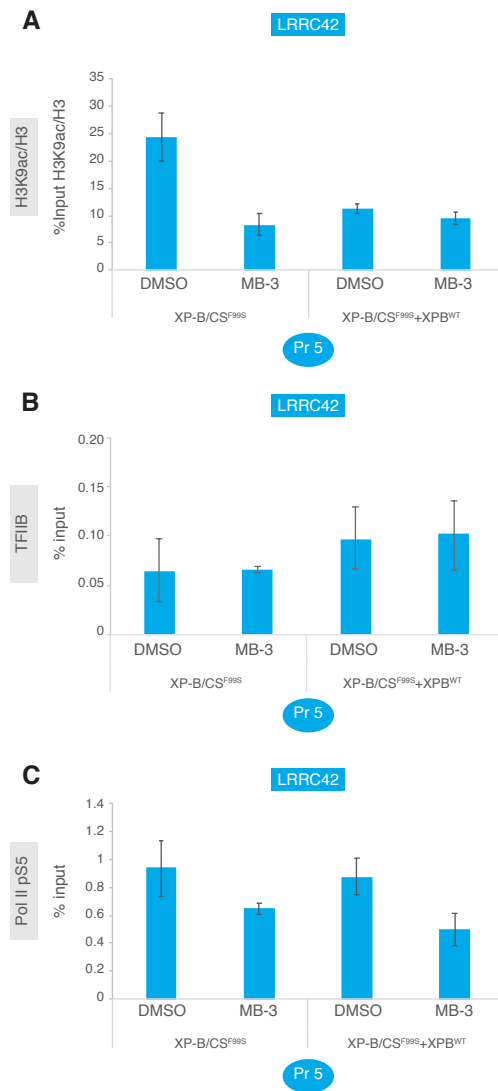
Supplementary Figure 2. Histones were extracted from either XP-B/CS^{F99S} or XP-B/CS^{F99S}+XPB^{WT}, resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with either polyclonal rabbit anti-histone H3, monoclonal mouse anti-histone H3K9Ac, polyclonal rabbit anti-histone H3K14Ac, monoclonal mouse anti-histone H3K4me3 or polyclonal rabbit anti-histone H3S10p.



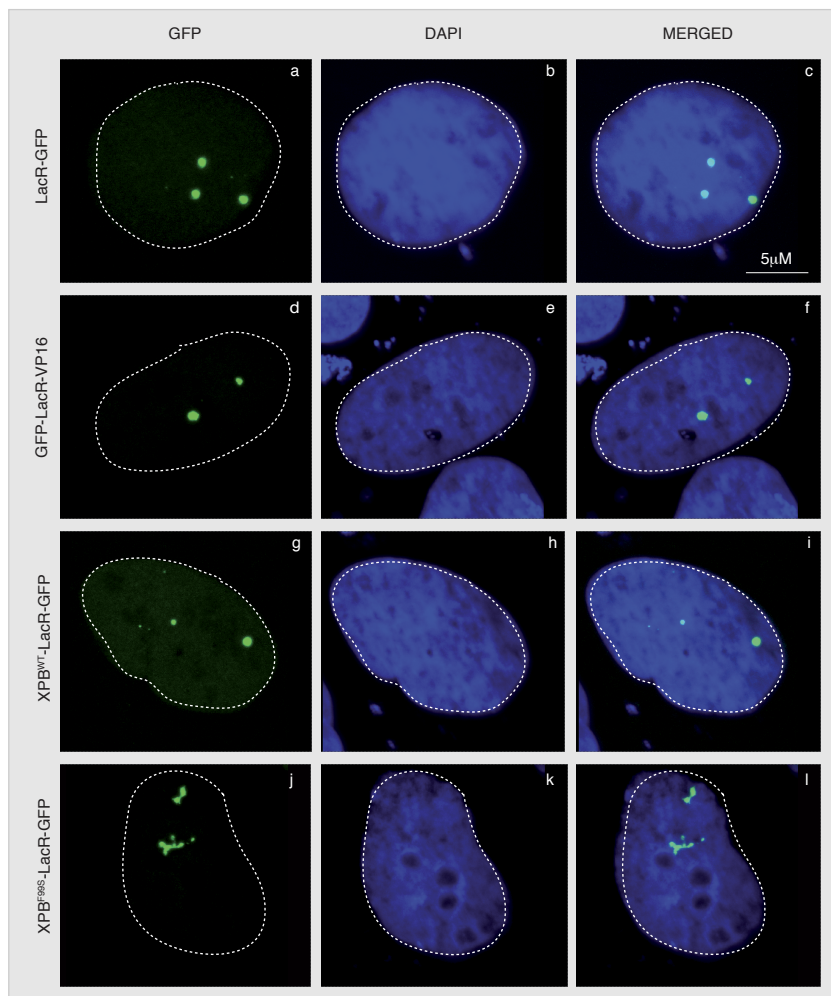
Supplementary Figure 3. (A). Nuclear extracts from U2OS or U2OS^{XPB::GFP} were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted using polyclonal rabbit anti-GFP. Alternatively, U2OS^{XPB::GFP} cells were fixed and GFP detected by fluorescent microscopy **(B)**. TFIIH was immunoprecipitated from nuclear extracts of U2OS^{XPB::GFP} cells using anti-GFP antibody (GFP-Trap[®]) and washed with 200mM salt. The control IP was performed with unspecific anti-IgG. Proteins on the resin were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted using polyclonal rabbit anti-GFP, monoclonal mouse anti-p44 (TFIIH), polyclonal rabbit anti-KAT2A, polyclonal rabbit anti-ZZZ3 (hATAC) or polyclonal rabbit anti-SUPT7L (hSAGA) antibodies.



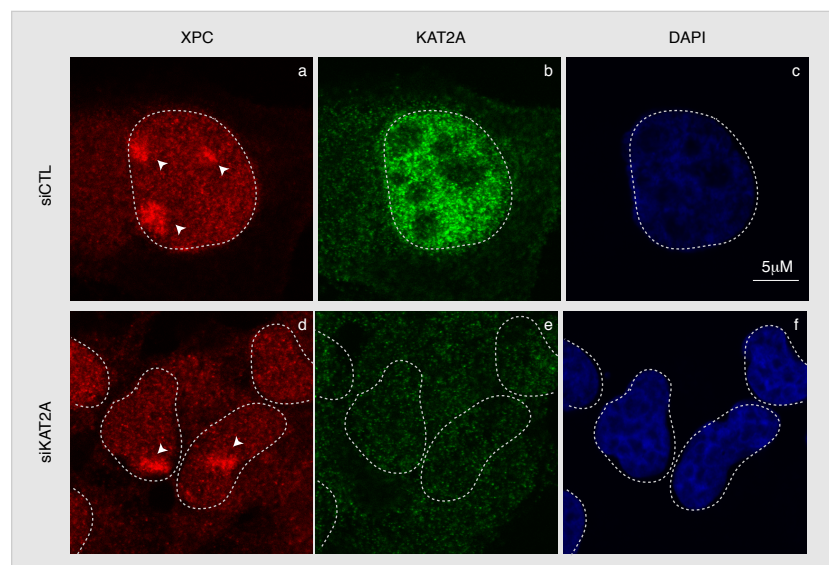
Supplementary Figure 4. (A-D), ChIP monitoring the occupancy of: KAT2A (A), H3K9ac/H3 (B), TFIIIB (C) and Pol II pS5 (D) on the promoter (Pr) regions of *CYP26* (Pr 3) and *NETO1* (Pr 4) genes in XP-B/CS^{F99S} and XP-B/CS^{F99S}+XPB^{WT} treated either with DMSO or MB-3. **(E-F)**, ChIP monitoring the occupancy of p62 (E) or XPB^{F99S} (F) TFIIH subunits on Pr 3 and 4 regions of *CYP26* and *NETO1* genes in XP-B/CS^{F99S} treated either with DMSO or MB-3.



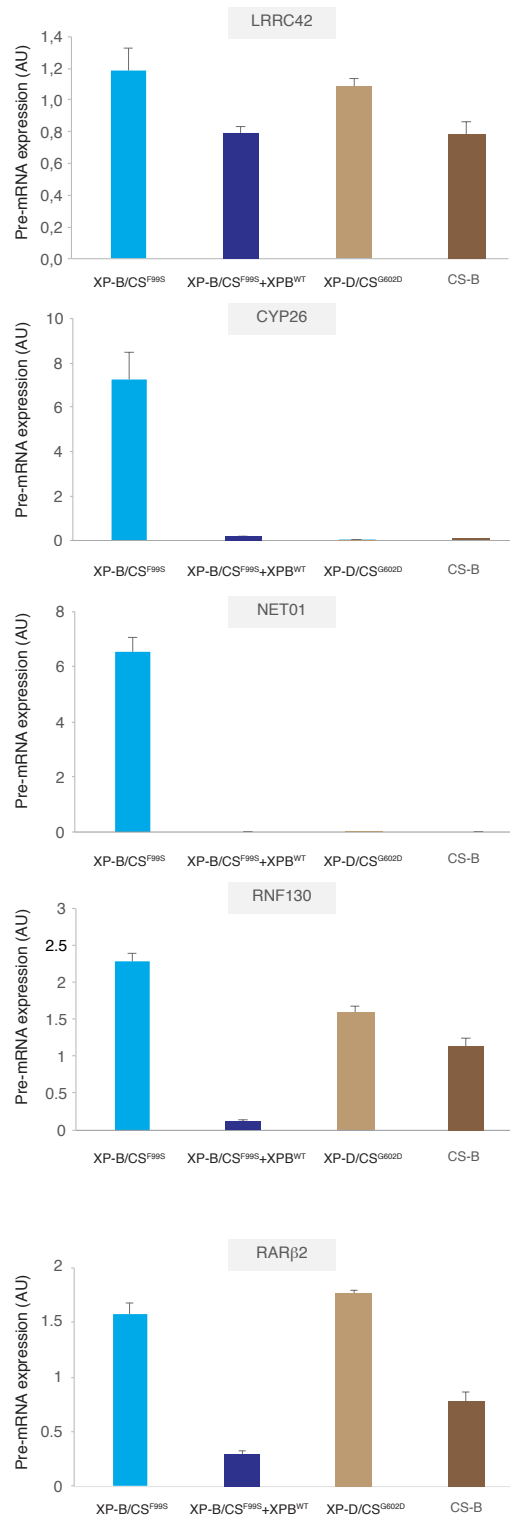
Supplementary Figure 5. (A-C), ChIP monitoring the occupancy of: H3K9ac/H3 (A), TFIIIB (B) and Pol II pS5 (C) on the promoter (Pr5) region of the *LRRC42* gene in XP-B/CS^{F99S} and XP-B/CS^{F99S}+XPB^{WT} treated either with DMSO or MB-3.



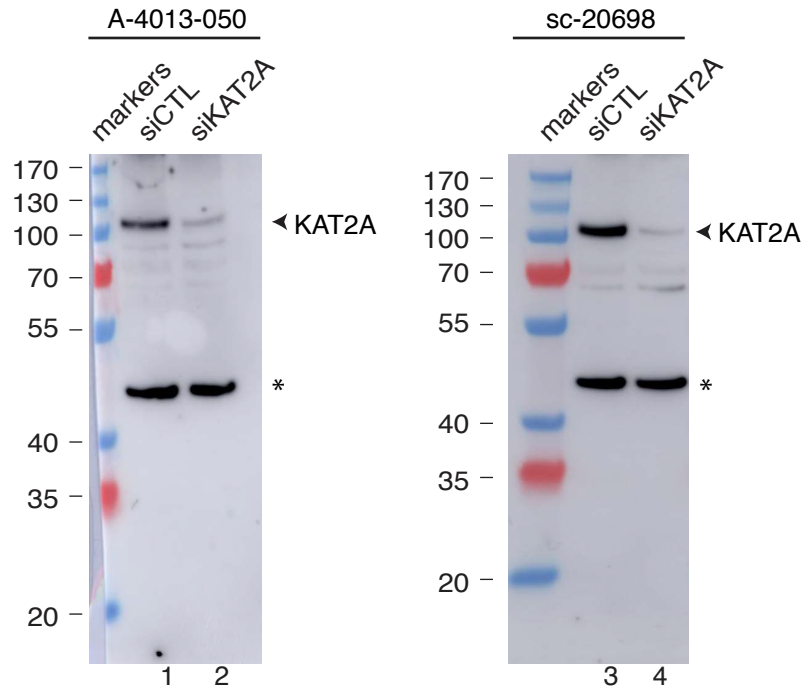
Supplementary Figure 6. LacR-GFP (a-b-c), GFP-LacR-VP16 (d-e-f)¹², XPB^{WT}-LacR-GFP (g-h-i) and XPB^{F99S}-LacR-GFP (j-k-l) were transfected in human U2OS17 cells and tethered to chromatin. GFP was detected by fluorescence microscopy 24 hrs post transfection and cells were stained with DAPI.



Supplementary Figure 7. Following treatment with siCTL or siKAT2A as performed in Figure 5, wild-type fibroblasts were locally UV-irradiated (100 J/m^2), fixed after 15 minutes and co-stained with rabbit polyclonal anti-XPC (a-d) and polyclonal rabbit anti-KAT2A (b-e) (for reference on local UV irradiation see ²³). Arrows indicate locally irradiated areas. Treatment with siKAT2A depletes KAT2A from cell nucleus but does not impair the recruitment of XPC to local irradiated areas.



Supplementary Figure 8. Pre-mRNA level (+/- SD, three independent experiments) of *LRRC42*, *CYP26*, *NETO1*, *RNF130* and *RARβ2* was analyzed in XP-B/CS^{F99S}, XP-B/CS^{F99S}+XPB^{WT}, XP-D/CS^{G602D} and CS-B cells. Data represent the relative expression levels of the pre-mRNA relative to GAPDH mRNA.



Supplementary Figure 9: MRC5 fibroblasts were transfected with siCTL or siKAT2A for 24hrs and 50 μ g of cell extracts were resolved by SDS-PAGE and immuno-blotted with the indicated Ab against KAT2A.

Conclusion

A travers ces études, nous avons finalement redéfini le rôle fondamental de XPB lors de l'initiation de la transcription.

1. L'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur

Nos travaux nous permettent de proposer un nouveau modèle d'action de XPB en transcription où XPB n'utiliserait pas son activité hélicase afin d'ouvrir l'ADN au niveau du promoteur mais agirait plutôt en tant que translocase. En effet, nos données indiquent que la synthèse des ARNm est très sensible à l'inhibition de l'activité ATPase de XPB mais paradoxalement s'accommode de la suppression de la protéine. Le seul modèle qui obéit à un tel comportement est celui proposé il y a quelques années par J. Gralla chez la levure et dans lequel XPB au sein de TFIIF constitue, de par sa présence, un frein à l'ouverture de l'ADN et à l'initiation de la transcription (Lin et al 2005). En hydrolysant l'ATP et en transloquant en aval du site d'initiation, XPB lèverait ce point de blocage et permettrait une ouverture de l'ADN sans hélicase, en utilisant uniquement l'énergie produite lors de la formation du PIC. On peut alors considérer XPB comme un nouvel élément de régulation de l'initiation de la transcription, permettant l'ouverture de l'ADN au moment approprié et dans un contexte optimal.

La visualisation de la transcription dans cette étude a été réalisée à travers un marquage EU dans les cellules. Ce marquage est incorporé dans tous les ARN nouvellement transcrits. Ainsi nous n'avons qu'une représentation globale de la transcription, ne distinguant pas les ARN transcrits par Pol I, II et III. Or la transcription des gènes de classe I par exemple est beaucoup plus productive que celle des gènes de classe II. De plus, certains gènes de classe II sont transcrits de manière plus importantes que d'autres. Cela signifie que si la transcription d'un groupe de gènes faiblement transcrits est dérégulée à cause de l'absence de XPB par le traitement à la SP, le marquage EU ne permettra pas de le visualiser. Dans ce cas-là, l'absence de XPB peut quand même avoir un rôle dans un certain nombre de gènes.

Suite à la publication de nos travaux, une étude a été réalisée par l'équipe de Patrick Cramer afin d'analyser la transcription des gènes en absence de XPB chez la levure en utilisant une technique de séquençage ciblant les ARN nouvellement transcrits (4sU-seq) chez la levure (Dienemann et al 2019). Ils ont alors montré que 20% des gènes n'étaient pas sensibles à la

suppression de XPB dans les cellules et que les autres répondaient à l'absence de XPB, indiquant qu'une fraction non négligeable de promoteurs chez la levure peut être ouverte en absence de XPB. Il est intéressant de noter que cette fraction insensible correspond principalement à des gènes essentiels pour la croissance cellulaire et transcrits à des niveaux élevés. S'il s'avérait que ces deux fractions de gènes répondant ou non à l'absence de XPB existent dans les cellules humaines, nous ne pouvions pas les observer par marquage EU à cause du haut niveau de transcription des gènes insensibles. Chez la levure en tout cas, les résultats de cette étude montrent que la dépendance de la transcription à la translocase XPB varie entre les gènes et indiquent que l'ouverture spontanée de l'ADN peut avoir lieu pour une fraction importante des promoteurs dépendants de Pol II *in vivo* en absence de XPB.

Le mécanisme de dégradation de XPB par la SP est encore mal connu. L'étude qui avait mené notre laboratoire à la découverte de l'effet de la SP sur XPB apportait quelques informations sur cette dégradation. En effet, elle est réalisée par le protéasome suite à la polyubiquitination de XPB (Alekseev et al 2014). Une étude récente a permis d'apporter des informations supplémentaires (Ueda et al 2019), montrant que la polyubiquitination de XPB était réalisée par le complexe SCF^{FBXL18}, un complexe E3 ubiquitine ligase. De manière intéressante, ils ont montré que la dégradation de XPB après traitement à la SP requiert l'activité kinase de CDK7 et suggèrent que le complexe de polyubiquitination agirait après un stimulus, correspondant à la phosphorylation de la sérine 90 de XPB par CDK7. En effet, il semble que l'inhibition ou la suppression de CDK7, ainsi que la mutation de la sérine 90 en alanine portent atteinte à la dégradation de XPB suite au traitement à la SP. Si cette phosphorylation de XPB par CDK7 sur la sérine 90 est confirmée, il est fort probable que la SP exploite à outrance un mécanisme de dégradation de XPB qui se fait dans la cellule de façon physiologique. Il serait donc intéressant de déterminer si ce mécanisme de phosphorylation de XPB a un rôle dans la cellule, que ce soit dans la transcription ou dans la réparation NER. On pourrait aussi suggérer que ce mécanisme de phosphorylation par CDK7 est néfaste pour la réparation NER et pourrait expliquer le départ du CAK durant ce processus (Coin et al 2008).

Les ADN translocases ont la capacité de « glisser » sur l'ADN sans briser les liaisons entre les nucléotides de chaque brin comme le ferait une hélicase classique et elles participent à de

nombreuses voies cellulaires, incluant la réparation de l'ADN, la réplication, la recombinaison, la transcription et le remodelage de la chromatine. Leur activité est souvent régulée par des interactions avec d'autres protéines ou entre domaines intraprotéiques, assurant seulement une translocation dans le contexte macromoléculaire adéquat. XPB correspond donc à une translocase plutôt qu'à une hélicase, et utiliserait cette activité afin de supprimer le blocage par TFIIH de l'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur pendant l'initiation de la transcription. Il serait intéressant d'observer par cristallographie les deux positions sur l'ADN de XPB sur le promoteur, avant et après sa translocation. XPB formerait alors un parfait exemple de protéine dont la structure ne reflète pas sa fonction. Cependant, le mécanisme de l'activation de l'ATPase de XPB au cours de ce processus reste inconnu.

Un autre exemple d'hélicase utilisant plutôt une activité translocase a déjà été mis en évidence. Il s'agit de la protéine Mfd, l'homologue procaryote de TRCF (*Transcription-Repair Coupling Factor*) (Smith et al 2012). En effet cette protéine fait partie de la superfamille SF2 contenant les 7 motifs hélicase caractéristiques comme XPB. Cette protéine joue un rôle central dans la TC-NER, où elle se lie à Pol II qui a été bloquée par une lésion de l'ADN sur le brin transcrit et transloque l'ADN immédiatement en amont du complexe de transcription bloqué. Mfd déplace alors Pol II de l'ADN endommagé vers l'arrière, permettant à la lésion d'être accessible pour les protéines de la réparation (Park et al 2002). Le contrôle de l'activité de cette protéine est intéressant puisqu'il se fait par autoinhibition. En effet, les domaines N- et C-terminaux de Mfd forment une sorte de pince inhibitrice autour du domaine servant à l'hydrolyse de l'ATP pour le mouvement de l'ADN. L'effet autoinhibiteur de cette pince est alors levé par changement de conformation quand Mfd se lie à Pol II (Murphy et al 2009).

L'activité translocase de XPB pourrait adopter ce genre d'auto-régulation, même si l'effet autoinhibiteur levé par l'interaction avec Pol II est peu probable mais pourrait être plutôt le résultat d'une interaction avec une autre protéine. Les facteurs NER pourraient être des candidats potentiels, notamment XPC, qui a déjà montré un effet stimulateur de l'activité ATPase de XPB durant le mécanisme NER.

De plus, une étude récente menée dans notre équipe a montré que la phosphorylation du CTD de Pol II par CDK7, dans des conditions *in vitro*, conduisait au départ du CAK et de TFII α . Il a aussi été montré que cette phosphorylation et ce départ se font indépendamment de l'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur (Compe et al 2019). Il

paraît peu probable que dans les cellules ces deux mécanismes soient indépendants et qu'on puisse se retrouver dans une situation où la cellule dépenserait de l'énergie afin de phosphoryler le CTD alors même que les conditions ne sont pas optimales pour sortir de la phase d'initiation de la transcription. On peut alors imaginer que cette protéine qui permettrait de lever l'autoinhibition de l'activité translocase de XPB et qui serait donc responsable de la translocation de XPB, serait aussi nécessaire pour l'action de CDK7, auquel cas la phosphorylation du CTD ne pourrait pas se faire sans ouverture de l'ADN au niveau du promoteur.

Ces hypothèses restent encore à être testées mais pour l'instant le mécanisme d'action de XPB et le déroulement de l'initiation de la transcription restent évasifs.

Néanmoins, ce dont on est sûr maintenant est l'absence de rôle connu pour les domaines hélicases et leur activité qui est dispensable à la fois dans la transcription et la réparation de l'ADN. Cette activité est certes faible *in vitro* comparée à d'autres hélicases comme XPD mais reste tout de même présente, pourtant elle n'a plus de fonction connue. Il est possible que ces motifs hélicase reflètent la capacité de XPB à seulement induire un déroulement local de l'ADN, qui pourrait par exemple faciliter l'action de l'hélicase XPD durant la réparation de l'ADN, sans être indispensable.

Cela dit, ces différentes informations devraient nous obliger à modifier et redéfinir la classification et la définition des hélicases. Doivent-elles être définies comme telles suivant leur structure ou plutôt selon leur fonction. Dans le premier cas, XPB reste une hélicase, dans le second, XPB doit être retiré de la famille des hélicases.

L'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur des gènes dépendants de Pol II est maintenant similaire à celle concernant les gènes dépendants de Pol I, III ou de la Pol bactérienne, dans le sens où elles sont indépendantes de l'action d'une hélicase. Concernant les gènes de classe II un point de contrôle supplémentaire est donc ajouté par la présence de XPB et TFIIH. Cependant, le marquage EU dans les nucléoles (transcription par Pol I) a aussi montré une absence d'effet suite à la suppression de XPB après traitement à la SP, et une diminution de la transcription par Pol I après l'inhibition de l'activité ATPase de XPB. Il est tout de même peu probable qu'un point de contrôle formé par XPB et TFIIH existe aussi pour l'initiation de la transcription par Pol I car il a déjà été montré que ni TFIIH, ni une activité hélicase, ni l'hydrolyse de l'ATP étaient nécessaires pour l'ouverture de l'ADN et que

TFIIH aurait un rôle après l'initiation de la transcription pour ces gènes de classe I (Iben et al 2002).

2. XPB et le remodelage de la chromatine

TFIIH a été caractérisé en 1989 comme un facteur général de transcription, impliqué dans la transcription des ARNm. Depuis, les fonctions de TFIIH ont été mises en évidence dans l'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur et la phosphorylation du CTD de Pol II permettant l'échappement du promoteur. Il faut maintenant lui ajouter un autre rôle lors de l'initiation de la transcription dans le remodelage de la chromatine.

En effet, une décondensation de la chromatine est observée lorsque XPB, contenant la mutation F99S ou ayant perdu son NTD, est immobilisé sur la chromatine par le système LacO/LacR alors que cette décondensation n'est pas observée lorsque la forme sauvage de XPB est immobilisée. Cette observation suggère un rôle de l'extrémité N-terminale de XPB dans l'organisation de la chromatine qui pourrait se faire dans des conditions physiologiques.

Le système LacO/LacR permet de forcer n'importe quelle protéine à se fixer à la chromatine. Il utilise les propriétés de l'opéron lactose chez la bactérie qui est le premier mécanisme complexe de régulation de gènes à avoir été identifié. Dans ce mécanisme, le LacR se fixe au LacO en absence de lactose afin de ne pas produire inutilement la β -galactosidase qui permet de cliver le lactose en sources d'énergies pour la cellule (glucose et galactose).

Dans nos cellules U2OS17 et AO3, ce système est donc très artificiel mais a été très utile afin de découvrir un rôle de XPB dans la décondensation de la chromatine.

La première étude mettant en avant l'intérêt de cette technique a montré qu'elle permettait de localiser *in vivo* des séquences d'ADN et de visualiser l'organisation de la chromatine (Robinett et al 1996). Cette approche a largement été utilisée depuis afin d'analyser la dynamique spatiale d'un locus spécifique d'un chromosome dans différents organismes allant de la levure aux cellules de mammifères (Belmont et al 1999 ; Gonzalez-Seriichio and Sternberg 2006 ; Lassadi and Bystricky 2011 ; Meister et al 2010 ; Masui et al 2011 ; Roukos et al 2013). Elle est particulièrement utile pour l'analyse des propriétés de mouvement de

loci spécifiques intacts ou endommagés (Dion and Grasser 2013, Mine-Hattab J and Rothstein R 2012 ; Roukos et al 2013). La méthodologie est facilement adaptable à d'autres applications qui requièrent la visualisation d'un locus d'un chromosome dans le génome des mammifères (Chubb et al 2002 ; Reddy et al 2008) ou l'intégration d'un rapporteur d'intérêt (Chuang et al 2006 ; Janicki et al 2004). De plus la haute affinité de la liaison du LacR sur la LacO ($Kd^{lac} \approx 10pM$) (Sadler et al 1983) permet un ciblage spécifique de la protéine d'intérêt fusionnée au LacR. Ce système avait déjà été utilisé dans notre laboratoire afin de déterminer le recrutement séquentiel des différents facteurs NER au niveau du complexe de pré-incision, où l'immobilisation d'un facteur NER entraîne le recrutement des facteurs NER suivants. Par exemple, l'immobilisation de XPC entraîne la formation d'un complexe de pré- incision complet (Ziani et al 2014). De plus, le ciblage de méthyltransférases et de lysine acétyltransférases sur le LacO de cellules U2OS a montré qu'il permettait le dépôt des modifications respectives des histones au niveau du locus (Burman et al 2015).

De façon similaire, l'immobilisation forcée sur la chromatine de différentes protéines ayant un rôle dans son remodelage a montré qu'elles étaient capables d'induire des changements dans la structure d'ordre supérieur de la chromatine. Par exemple, le ciblage de la protéine HP1 sur le LacO provoque une condensation de la chromatine (Verschure et al 2005). Ce système a aussi été utilisé dans une étude montrant le rôle de DDB2 dans la décondensation d'ordre supérieur de la chromatine, dépendante de l'hydrolyse de l'ATP et de l'action de l'enzyme PARP (Luijsterburg et al 2012), mettant en avant l'intérêt de ce système dans ce type d'étude.

Nous avons ensuite mis en évidence une interaction de TFIIH avec un nouveau partenaire, où XPB interagit directement avec KAT2A (GCN5) contenu dans les complexes SAGA ou ATAC. Il a aussi été montré par des tests d'acétylation *in vitro* que la mutation F99S ou la suppression de l'extrémité N-terminale de XPB induisent un gain de fonction de KAT2A entraînant une stimulation de son activité HAT. Le NTD de XPB serait donc capable de réguler l'activité enzymatique de KAT2A et pourrait avoir un rôle dans des conditions physiologiques à travers cette interaction et cette régulation lors de l'initiation de la transcription. En effet, dans les cellules de patients portant la mutation F99S, la perte d'intégrité du NTD provoque un recrutement anormal de TFIIH et KAT2A au niveau du promoteur d'un certain nombre de gènes et une hyperacétylation en raison du gain de

fonction de KAT2A, menant à la formation aberrante de complexes d'initiation de la transcription et leur surexpression. De plus, ces éléments reviennent à un niveau de base lorsque KAT2A est inhibé ou quand les cellules sont restaurées par l'expression de la forme sauvage de XPB, mettant en évidence le lien existant entre ces deux acteurs cellulaires majeurs.

Au niveau moléculaire, deux mécanismes expliquant le gain de fonction de KAT2A opéré par XPB peuvent être proposés, expliquant le niveau élevé de H3K9Ac dans les cellules de patient XPCS2BASV. Le premier est que XPB séquestre KAT2A sur la chromatine et le retient de façon anormalement prolongée, ce qui induit l'acétylation aberrante de H3K9.

Le second mécanisme est basé sur un effet inhibiteur du NTD de XPB sauvage sur l'activité HAT de KAT2A. La mutation F99S, qui pourrait structurellement modifier le NTD, ou l'absence du NTD, pourraient entraver cet effet inhibiteur et l'activité de KAT2A serait alors augmentée, expliquant aussi l'acétylation excessive de H3K9 au niveau du promoteur de certains gènes et même au-delà de ces promoteurs. Cette explication se heurte cependant à nos observations *in vitro* où l'ajout de XPB ou TFIIH n'inhibent pas l'activité de KAT2A.

La localisation de SAGA sur génome entier et la contribution de SAGA et KAT2A dans la transcription des gènes de classe II chez la levure a été étudiée récemment (Baptista et al 2017). SAGA est essentiellement requis pour la synthèse des ARN de la grande majorité des gènes transcrits par Pol II avec un rôle essentiel pour l'activité HAT de KAT2A. Les auteurs vont plus loin en citant même SAGA comme cofacteur général pour le recrutement du PIC, requis pour la transcription d'une vaste majorité des gènes de classe II chez la levure. Ceci étant, si un des deux mécanismes proposés précédemment est avéré, la majorité des gènes devrait être dérégulée dans les cellules de patients portant la mutation F99S étant donné la suractivation de KAT2A. Cependant dans notre étude, environ 600 gènes seulement sont dérégulés, dont environ 400 qui sont surexprimés. Chez l'Homme, il semblerait donc que la transcription des gènes par Pol II dépendante de KAT2A concernait qu'un groupe de gènes seulement et non la majorité des gènes comme c'est le cas chez la levure.

On peut alors se poser la question de l'existence du NTD de XPB qui est présent chez l'Homme alors qu'il ne l'est pas chez *Archaeoglobus fulgibus* par exemple. En effet la

structure cristallographique de AfXPB révèle qu'il contient seulement un petit domaine N-terminal ayant une similarité structurale avec le domaine de reconnaissance des mésappariements de MutS, appelé domaine de reconnaissance des dommages (DRD) (Fan et al 2006). De plus, des homologues de XPB chez des archées ou des bactéries possèdent aussi un NTD plus long que le DRD (Balasingham et al 2012, Ma et al 2011, Rouillon and White 2011). Cependant, les résidus Phe99 et Thr119, modifiés chez des patients XP-B, sont seulement conservés chez les eucaryotes. L'apparition de cette longue extrémité pourrait alors correspondre à une évolution servant de point de régulation supplémentaire pour l'expression d'un groupe de gènes particuliers chez des organismes complexes, non présent chez des organismes plus simples comme *Archaeoglobus fulgibus*.

Ensuite, il est difficilement envisageable que l'acétylation de H3K9 suffise à elle seule à induire la décondensation massive de la chromatine observée suite à l'immobilisation de XPB F99S grâce au système LacO/LacR. D'autres protéines seraient aussi responsables de cette décondensation. En effet, un nombre varié de protéines, appelées « *readers* », contiennent un bromodomaine et sont capables de reconnaître et de se lier à la marque d'acétylation sur des histones. Par exemple, la protéine BRD4, membre de la famille des protéines BET (*Bromodomain and Extra Terminal domain*), est capable de se lier, via son bromodomaine, à H4K5 acétylé et permet d'accélérer la dynamique de la synthèse des ARN messenger en décondensant la chromatine et ainsi faciliter l'activation transcriptionnelle (Zhao et al 2011). Dans notre cas, l'acétylation de H3K9 pourrait contribuer au recrutement spécifique de protéines ayant un rôle dans la décondensation de la chromatine en agissant directement sur la chromatine ou permettant le recrutement d'autres protéines, faisant le lien entre l'acétylation de la lysine et les interactions protéine-protéine médiées par l'acétylation (Sanchez and Zhou 2009).

On peut ensuite se demander quel est le rôle de cette décondensation de la chromatine induite par l'acétylation de H3K9, qui aurait lieu au niveau du promoteur d'un groupe de gènes dans les cellules XPCS2BASV. Cette décondensation pourrait simplement faciliter l'accès des facteurs protéiques au niveau du promoteur et ainsi augmenter l'expression des gènes sous dépendance de ces promoteurs. Il serait intéressant aussi de voir si cette décondensation pourrait permettre de faciliter la formation de boucles de la chromatine et

favoriser le rapprochement du promoteur de ces gènes avec des séquences régulatrices, modulant ainsi l'expression de ces gènes. Le gène *RARβ2* est dans des conditions physiologiques exprimé qu'en présence d'acide rétinoïque (AR). L'AR se fixe et active à son récepteur cible qui va se fixer au niveau de son élément de réponse et via une boucle de chromatine, activer l'expression de ses gènes cibles. Dans les cellules de patient, l'expression de *RARβ2* sans présence d'AR peut laisser penser que la décondensation de la chromatine induite par H3K9Ac au niveau du promoteur de *RARβ2* pourrait induire la formation de boucles de chromatine rapprochant le promoteur avec des séquences activatrices, sans activation du récepteur RAR.

Il a aussi été montré dans notre équipe la présence d'une collaboration entre KAT2A, XPC et le facteur de transcription E2F1 au niveau du promoteur d'un groupe de gènes dans les cellules (Bidon B et al 2018). Dans cette étude, le facteur NER XPC est recruté au niveau du promoteur en absence de stress génotoxique, régulant l'expression de plus de 500 gènes. Le facteur de transcription E2F1 interagit avec XPC et est requis pour sa localisation au niveau du promoteur des gènes actifs. Puis le complexe XPC, E2F1 et KAT2A est formé au niveau des promoteurs dépendants de XPC, menant à la présence de ATAC et le dépôt de la marque H3K9Ac, remodelant ainsi la chromatine et initiant l'expression des gènes de classe II. Un modèle pourrait alors être proposé où XPC et E2F1 recruteraient KAT2A contenu dans ATAC au niveau d'un groupe de gènes particulier, KAT2A interagirait alors avec XPB qui lui-même régulerait l'activité HAT de KAT2A afin de déposer de façon adéquate la marque d'histone H3K9Ac et régulant ainsi l'expression de ce groupe de gènes.

Enfin, cette étude est basée sur la stratégie qui consiste à étudier des cellules de patients afin d'étudier les effets de la mutation sur un gène et en déduire le rôle physiologique de la protéine dépendante de ce gène. Le but premier est donc d'abord la compréhension du processus physiologique. Néanmoins, cette étude apporte des informations sur les patients CS en particulier, qui pourraient permettre de comprendre cette maladie. En effet, certains gènes sont dérégulés de façon commune à différentes lignées cellulaires CS. Il serait intéressant de réaliser une étude plus large sur des cellules de patients CS afin d'identifier les gènes dérégulés dans toutes ces cellules. Cela permettrait de comprendre l'origine des phénotypes de ces patients. Par exemple, dans cette étude, NETO1 est impliquée dans le

développement et le maintien des circuits neuronaux. Cette protéine est nécessaire pour la plasticité synaptique, la mémoire et l'apprentissage (Ng et al 2009). L'expression de cette protéine étant dérégulée, elle pourrait être à l'origine de certains symptômes neurologiques du patient.

Cela dit, le modèle d'étude correspond à des fibroblastes de patients provenant de la peau. Il serait intéressant d'analyser les gènes qui sont dérégulés chez ces patients dans des cellules neuronales par exemple, qui pourrait révéler les réelles causes de leurs symptômes neurologiques. Il serait alors intéressant de dé-différencier ces fibroblastes de patients en cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS) puis les différencier en cellules neuronales par exemple.

3. Parallèles entre ces deux études

Le protéine XPB est donc pleine de contradictions et d'inconnu. Les tentatives d'effectuer une déplétion complète de XPB chez la souris ont toujours échoué car son absence n'est pas compatible avec la vie du fait de son rôle essentiel dans la cellule (Ahmad and Hanaoka 2008). Ainsi il a souvent été souligné que la présence de peu de patients porteurs de mutations retrouvées dans XPB était due au rôle absolument essentiel de cette protéine et au fait que des mutations dans son gène n'étaient pas compatibles avec la vie. Cependant, la première étude suggère que ce n'est peut-être pas le cas et que finalement, une mutation dans XPB, notamment au niveau de ses domaines hélicase, pourrait être présente sans que cela ait des répercussions phénotypiquement importantes. Finalement, seules des mutations dans les deux extrémités de XPB conduiraient à l'apparition de phénotypes ; l'extrémité N-terminale à travers cette deuxième étude et l'extrémité C-terminale à travers son rôle dans la régulation de l'endonucléase ERCC1-XPF (Hilario et al 2013) et dans laquelle une mutation a été retrouvée chez un patient XP-B/CS avec un phénotype sévère (Weeda et al 1990b).

Pour finir, le deuxième parallèle que l'on pourrait faire entre ces deux études serait de proposer un mécanisme mêlant les deux rôles de XPB lors de l'initiation de la transcription, pour un groupe de gènes très régulé, dans l'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur et la décondensation de la chromatine via la régulation de KAT2A. XPB serait responsable du

blocage de l'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur. Une protéine serait alors recrutée au moment où les conditions sont optimales pour assurer la transcription du gène et entraînerait un changement de conformation de XPB et la levée de l'autoinhibition de l'activité translocase de XPB. La translocation de XPB en aval du TSS aurait donc lieu, provoquant l'ouverture de l'ADN au niveau du promoteur. De façon simultanée, le changement de conformation de XPB entraînerait la levée de l'inhibition par l'extrémité N-terminale de XPB sur l'activité HAT de KAT2A, menant à l'acétylation de H3K9 au niveau du promoteur. Les « readers » de H3K9Ac seraient alors recrutés afin de participer à la décondensation de la chromatine et faciliter la transcription du gène.

Références

Aboussekhra A, Biggerstaff M, Shivji MK, Vilpo JA, Moncollin V, Podust VN, Protić M, Hübscher U, Egly JM and Wood RD (1995) Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* **80**: 859-868

Adamczewski JP, Rossignol M, Tassan JP, Nigg EA, Moncollin V and Egly JM (1996) MAT1, cdk7 and cyclin H form a kinase complex which is UV light-sensitive upon association with TFIIH. *EMBO Journal* **15**: 1877-1884

Ahmad SI and Hanaoka F (2008) Molecular mechanisms of xeroderma pigmentosum. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **637**

Akhtar MS, Heidemann M, Tietjen JR, Zhang DW, Chapman RD, Eick D and Ansari AZ (2009) TFIIH kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Molecular Cell* **34**: 387-393

Alekseev S, Ayadi M, Brino L, Egly JM, Larsen AK and Coin F (2014) A small molecule screen identifies an inhibitor of DNA repair inducing the degradation of TFIIH and the chemosensitization of tumor cells to platinum. *Chemistry & biology* **21**: 398-407

Alekseev S, Nagy Z, Sandoz J, Weiss A, Egly JM, Le May N and Coin F (2017) Transcription without XPB establishes a unified helicase-independent mechanism of promoter opening in eukaryotic gene expression. *Molecular Cell* **65**: 504-514

Allfrey VG and Mirsky AE (1964) Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Science* **144**: 559

Andrau JC, Van de Pasch L, Lijnzaad P, Bijma T, Koerkamp MG, van de Peppel J, Werner M and Holstege FC (2006) Genome-wide location of the coactivator mediator: Binding without activation and transient Cdk8 interaction on DNA. *Molecular Cell* **22**: 179-192

Araki M, Masutani C, Takemura M, Uchida A, Sugasawa K, Kondoh J, Ohkuma Y and Hanaoka F (2001) Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 18665-18672

Araújo SJ, Tirode F, Coin F, Pospiech H, Syväoja JE, Stucki M, Hübscher U, Egly JM and Wood RD (2000) Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes & Development* **14**: 349-359

Arents G and Moudrianakis EN (1995) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**: 11170-11174

Archambault J, Pan G, Dahmus GK, Cartier M, Marshall N, Zhang S, Dahmus ME and Greenblatt J (1998) FCP1, the RAP74-interacting subunit of a human protein phosphatase

that dephosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 27593-27601

Armache KJ, Kettenberger H and Cramer P (2003) Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100**: 6964-6966

Balasingham SV, Zegeye ED, Homberset H, Rossi ML, Laerdahl JK, Bohr VA and Tonjum T (2012) Enzymatic activities and DNA substrate specificity of Mycobacterium tuberculosis DNA helicase XPB. *PLoS One* **7**: e36960

Bannister AJ and Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* **21**: 381-395

Baptista T, Grünberg S, Minoungou N, Koster MJE, Timmer M, Hahn S, Devys D and Tora L (2017) SAGA is a general cofactor for RNA polymerase II transcription. *Molecular Cell* **68**: 130-143

Barreto G, Schäfer A, Marhold J, Stach D, Swaminathan SK, Handa V, Döderlein G, Maltry N, Wu W, Lyko F and Niehrs C (2007). Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* **445**: 671-675

Bedford MT and Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Molecular Cell* **33**: 1-13

Bednar J, Garcia-Saez I, Boopathi R, Cutter AR, Papai G, Reymer A, Syed SH, Lone IN, Tonchev O, Crucifix C, Menoni H, Papin C, Skoufias DA, Kurumizaka H, Lavery R, Hamiche A, Hayes JJ, Schultz P, Angelov D, Petosa C, Dimitrov S (2017) Structure and dynamics of a 197 bp nucleosome in complex with linker histone H1. *Molecular cell* **66**: 384-397

Beerens N, Hoeijmakers JHJ, Kanaar R, Vermeulen W and Wyman C (2005) The CSB protein actively wraps DNA. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 4722-4729

Belmont AS, Li G, Sudlow G and Robinett C (1999) Visualization of large-scale chromatin structure and dynamics using the lac operator/ lac repressor reporter system. *Methods in Cell Biology* **58**: 203-222

Bernecky C, Herzog F, Baumeister W, Plitzko JM and Cramer P (2016) Structure of transcribing mammalian RNA polymerase II. *Nature* **529**: 551-554

Bernecky C, Plitzko JM and Cramer P (2017) Structure of a transcribing RNA polymerase II-DSIF complex reveals a multidentate DNA-RNA clamp. *Nature Structural & Molecular Biology* **24**: 809-815

Bidon B, Iltis I, Semer M, Nagy Z, Larnicol A, Cribier A, Benkirane M, Coin F, Egly JM and Le May N (2018) XPC is an RNA polymerase II cofactor recruiting ATAC to promoters by interacting with E2F1. *Nature Communications* **9**: 2610

Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* **16**: 6-21

Bird A and Wolffe AP (1999) Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**: 451-454

Bootsma D and Hoeijmakers JHJ (1993) DNA repair. Engagement with transcription. *Nature* **363**: 114-115

Botta E, Nardo T, Lehmann AR, Egly JM, Pedrini AM and Stefanini M (2002) Reduced level of the repair/transcription factor TFIIH in trichothiodystrophy. *Human Molecular Genetics* **11**: 2919-2928

Botta E, Offman J, Nardo T, Ricotti R, Zambruno G, Sansone D, Balestri P, Raams A, Kleijer WJ, Jaspers NG, Sarasin A, Lehmann AR and Stefanini M (2007) Mutations in the C7orf11 (TTDN1) gene in six nonphotosensitive trichothiodystrophy patients: no obvious genotype-phenotype relationships. *Human Mutation* **28**: 92-96

Botuyan MV and Mer G (2016) Tudor domains as methyl-lysine and methyl-arginine readers. *Biochemistry and Molecular Biology* **8**: 149-165

Boulon S, Pradet-Balade B, Verheggen C, Molle D, Boireau S, Georgieva M, Azzag K, Robert MC, Ahmad Y, Neel H, Lamond AI and Bertrand E (2010) HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Molecular Cell* **39**: 912-924

Bradford PT, Goldstein AM, Tamura D, Khan SG, Ueda T, Boyle J, Oh KS, Imoto K, Inui H, Moriwaki S, Emmert S, Pike KM, Raziuddin A, Plona TM, DiGiovanna JJ, Tucker MA, Kraemer KH (2011) Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterises the role of DNA repair. *Journal of Medical Genetics* **48**: 168-176

Brooks PJ (2013) Blinded by the UV light: How the focus on transcription-coupled NER has distracted from understanding the mechanisms of Cockayne syndrome neurologic disease. *DNA Repair* **12**: 656-671

Buratowski S, Hahn S, Guarente L and Sharp PA (1989) Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* **56**: 549-561

Buratowski S (2009) Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Molecular Cell* **36**: 541-546

Burke TW and Kadonaga JT (1996) Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes & Development* **10**: 711-724

Burke TW and Kadonaga JT (1997) The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila. *Genes & Development* **11**: 3020-3031

Burley SK and Roeder RG (1996) Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annual Review of Biochemistry* **65**: 769-799

Burman B, Zhang ZZ, Pegoraro G, Lieb JD and Misteli T (2015) Histone modifications predispose genome regions to breakage and translocation. *Genes & Development* **29**: 1393-1402

Burton ZF, Killeen M, Sopta M, Ortolan LG and Greenblatt J (1988) RAP30/74: a general initiation factor that binds to RNA polymerase II. *Molecular and Cellular Biology* **8**: 1602-1613

Cao J and Yan Q (2012) Histone ubiquitination and deubiquitination, DNA damage response and cancer. *Frontiers in Oncology* **2**: 26

Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J, Semple CAM, Taylor MS, Engström PG, Frith MC, Forrest AR, Alkema WB, Tan SL, Plessy C, Kodzius R, Ravasi T, Kasukawa T, Fukuda S, Kanamori-Katayama M, Kitazume Y, Kawaji H, Kai C, Nakamura M, Konno H, Nakano K, Mottagui-Tabar S, Arner P, Chesi A, Gustincich S, Persichetti F, Suzuki H, Grimmond SM, Wells CA, Orlando V, Wahlestedt C, Liu ET, Harbers M, Kawai J, Bajic VB, Hume DA and Hayashizaki Y (2006) Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nature Genetics* **38**: 626-635

Chalkley GE and Verrijzer CP (1999) DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *EMBO Journal* **18**: 4835-4845

Chatzinikolaou G, Apostolou Z, Aid-Pavlidis T, Ioannidou A, Karakasilioti I, Papadopoulos GL, Aivaliotis M, Tsekrekou M, Strouboulis J, Kosteas T and Garinis GA (2017) ERCC1-XPF cooperates with CTCF and cohesin to facilitate the developmental silencing of imprinted genes. *Nature Cell Biology* **19**: 421-432

Chipumuro E, Marco E, Christensen CL, Kwiatkowski N, Zhang T, Hatheway CM, Abraham BJ, Sharma B, Yeung C, Altabef A, Perez-Atayde A, Wong KK, Yuan GC, Gray NS, Young RA and George RE (2014) CDK7 inhibition suppresses super-enhancer-linked oncogenic transcription in MYCN-driven cancer. *Cell* **159**: 1126-1139

Cho E, Tagaki T, Moore CR and Buratowski S. (1997) mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes & Development* **11**: 3319-3326

Choi CH, Hiromura M and Usheva A (2003) Transcription factor IIB acetylates itself to regulate transcription. *Nature* **424**: 965-969

Christensen CL, Kwiatkowski N, Abraham BJ, Carretero J, Al-Shahrour F, Zhang T, Chipumuro E, Herter-Sprie GS, Akbay EA, Altabef A, Zhang J, Shimamura T, Capelletti M, Reibel JB, Cavanaugh JD, Gao P, Liu Y, Michaelsen SR, Poulsen HS, Aref AR, Barbie DA, Bradner JE, George RE, Gray NS, Young RA and Wong KK. (2014) Targeting transcriptional addictions in small cell lung cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Cancer Cell* **26**: 909-922

- Chuang CH, Carpenter AE, Fuchsova B, Johnson T, de Lanerolle P and Belmont AS (2006) Long-range directional movement of an interphase chromosome site. *Current Biology* **16**: 825-831
- Chubb JR, Boyle S, Perry P and Bickmore WA (2002) Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells. *Current Biology* **12**: 439-445
- Chugh R, Sangwan V, Patil SP, Dudeja V, Dawra RK, Banerjee S, Schumacher RJ, Blazar BR, Georg GI, Vickers SM and Saluja AK (2012) A preclinical evaluation of Minnelide as a therapeutic agent against pancreatic cancer. *Science Translational Medicine* **4**: 156ra139.
- Cleaver JE (1968) Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* **218**: 652-656
- Cleaver JE, Lam ET and Revet I (2009) Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nature Reviews Genetics* **10**: 756-768
- Coin F, De Santis LP, Nardo T, Zlobinskaya O, Stefanini M and Egly JM (2006) p8/TTD-A as a repair-specific TFIIH subunit. *Molecular Cell* **21**: 215-226
- Coin F, Oksenysh V, Mocquet V, Groh S, Blattner C and Egly JM (2008) Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH. *Molecular Cell* **31**: 9-20
- Coin F, Bergmann E, Tremeau-Bravard A and Egly JM (1999) Mutations in XPB and XPD helicases found in xeroderma pigmentosum patients impair the transcription function of TFIIH. *EMBO Journal* **18**: 1357-1366
- Coin F, Marinoni JC, Rodolfo C, Fribourg S, Pedrini AM and Egly JM (1998) Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. *Nature Genetics* **20**: 184-188
- Coin F, Oksenysh V and Egly JM (2007) Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during NER. *Molecular cell* **26**: 245-256
- Colella S, Nardo T, Mallery D, Borrone C, Ricci R, Ruffa G, Lehman AR and Stefanini M (1999) Alterations in the CSB gene in three italian patients with the severe form of cockayne syndrome (CS) but without clinical photosensitivity. *Human Molecular Genetics* **8**: 935-941
- Compe E and Egly JM (2012) TFIIH : When transcription met DNA repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**: 345-354
- Compe E and Egly JM (2016) Nucleotide Excision Repair and Transcriptional Regulation: TFIIH and Beyond. *Annual Review of Biochemistry* **85**: 265-290
- Compe E, Genes CM, Braun C, Coin F and Egly JM (2019) TFIIH orchestrates the recruitment of the TFIIH kinase module at promoter before release during transcription. *Nature communications* **10**: 2084

Conaway JW and Conaway RC (1989) A multisubunit transcription factor essential for accurate initiation by RNA polymerase II. *Journal of biological chemistry* **264**: 2357-2362

Conaway RC, Garrett KP, Hanley JP and Conaway JW (1991) Mechanism of promoter selection by RNA polymerase II: mammalian transcription factors α and $\beta\gamma$ promote entry of polymerase into the preinitiation complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**: 6205-6209

Cook PR (2003) Nongenic transcription, gene regulation and action at a distance. *Journal of Cell Science* **116**: 4483-4491

Corden J, Cadena DL, Ahearn JM and Dahmus ME (1985) A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of the eukaryotic RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **82**: 7934-7938

Corden J, Wasylyk B, Buchwalder A, Sassone-Corsi P, Kedinger C and Chambon P (1980) Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science* **209**: 1406-1414

Cramer P, Bushnell DA and Kornberg RD (2001) Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Angstrom Resolution. *Science* **292**: 1863-1876

Deng W and Roberts SGE (2005) A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. *Genes & Development* **19**: 2418-2423

Deng W and Blobel GA (2010) Do chromatin loops provide epigenetic gene expression states? *Current Opinion in Genetics & Development* **20**: 548-554

Devault A, Martinez AM, Fesquet D, Labbé JC, Morin N, Tassan JP, Nigg EA, Cavadore JC and Dorée M (1995) MAT1 ('menage à trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK. *EMBO Journal* **14**: 5027-5036

DiGiovanna JJ and Kraemer KH (2012) Shining a light on Xeroderma pigmentosum. *Journal of Investigative Dermatology* **132**: 785-796

Dienemann C, Schwalb B, Schilbach S and Cramer P (2019) Promoter distortion and opening in the RNA polymerase II cleft. *Molecular Cell* **73**: 97-106

Dikstein R, Ruppert S and Tjian R (1996) TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74. *Cell* **84**: 781-790

Dion V and Gasser SM (2013) Chromatin movement in the maintenance of genome stability. *Cell* **152**: 1355-1364

Douziech M, Coin F, Chipoulet JM, Arai Y, Ohkuma Y, Egly JM and Coulombe B. (2000) Mechanism of promoter melting by the xeroderma pigmentosum complementation group B helicase of transcription factor IIH revealed by protein-DNA photo-cross-linking. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 8168-8177

Egloff S, O'Reilly D, Chapman RD, Taylor A, Tanzhaus K, Pitts L, Eick D and Murphy S (2007) Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression. *Science* **318**: 1777-1779

Egloff S, Dienstbier M and Murphy S (2012) Updating the RNA polymerase CTD code : adding gene-specific layers. *Trends in genetics* **28**: 333-341

El Kaderi B, Medler S, Raghunayakula S and Ansari A (2009) Gene looping is conferred by activator-dependent interaction of transcription initiation and termination machineries. *The journal of biological chemistry* **284**: 25015-25025

Fan L, Arvai AS, Cooper PK, Iwai S, Hanaoka F and Tainer JA (2006) Conserved XPB core structure and motifs for DNA unwinding: Implications for pathway selection of transcription or excision repair. *Molecular Cell* **22**: 27-37

Feaver WJ, Gileadi O and Kornberg RD (1991) Purification and characterization of yeast RNA polymerase II transcription factor b. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 19000-19005

Ferri D, Oriolo D and Botta E (2019) Heterogeneity and overlaps in nucleotide excision repair disorders. *Clinical Genetics*

Fishburn J, Tomko E, Galburt E and Hahn S (2015) Double-stranded DNA translocase activity of transcription factor TFIIH and the mechanism of RNA polymerase II open complex formation. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* **112**: 3961-3966

Fitch ME, Nakajima S, Yasui A and Ford JM (2003) In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 46906-46910

Flores O, Lu H, Killeen M, Greenblatt J, Burton ZF and Reinberg D (1991) The small subunit of transcription factor IIF recruits RNA polymerase II into the preinitiation complex. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* **88**: 9999-10003

Fousteri M, Vermeulen W, van Zeeland AA and Mullenders LHF (2006) Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II *in vivo*. *Molecular Cell* **23**: 471-482

Fregoso M, Lainé JP, Aguilar-Fuentes J, Mocquet V, Reynaud E, Coin F, Egly JM and Zurita M (2007) DNA repair and transcriptional deficiencies caused by mutations in the *Drosophila* p52 subunit of TFIIH generate developmental defects and chromosome fragility. *Molecular and Cellular Bioogy* **27**: 3640-3650

Genes Robles CM and Coin F (2019) Conducting the CTD orchestra. *Nature chemical biology* **15**: 97-98

Gerard ML, Fischer, Moncollin V, Chipoulet JM, Chambon P and Egly JM (1991) Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B (II) general transcription factor BTF2. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 20940-20945

Gibbons BJ, Brignole EJ, Azubel M, Murakami K, Voss NR, Bushnell DA, Asturias FJ, Kornberg RD (2012) Subunit architecture of general transcription factor TFIID. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* **109**: 1949–1954

Giglia-Mari G, Coin F, Ranish JA, Hoogstraten D, Theil A, Wijgers N, Jaspers NG, Raams A, Argentini M, van der Spek PJ, Botta E, Stefanini M, Egly JM, Aebersold R, Hoeijmakers JH, Vermeulen W (2004) A new, tenth subunit of TFIID is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nature Genetics* **36**: 714-719

Gnatt AL, Cramer P, Fu J, Bushnell DA and Kornberg RD (2001) Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Angstrom resolution. *Science* **292**: 1876-1882

Goldsborough AS and Kornberg TB (1996) Reduction of transcription by homologue asynapsis in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* **381**: 807-810

Gonzalez-Serricchio AS and Sternberg PW (2006) Visualization of *C. elegans* transgenic arrays by GFP. *BMC Genetics* **7**: 36

Greber BJ, Nguyen THD, Fang J, Afonine PV, Adams PD, Nogales E (2017) The cryo-electron microscopy structure of human transcription factor IID. *Nature* **549**: 414-417

Greber BJ, Toso DB, Fang J and Nogales E (2019) The complete structure of the human TFIID core complex. *Elife* **8**: e44771

Greer EL and Shi Y (2012) Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics* **13**: 343-357

Groisman R, Kuraoka I, Chevallier O, Gaye N, Magnaldo T, Tanaka K, Kisselev AF, Harel-Bellan A and Nakatani Y (2006) CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. *Genes & Development* **20**: 1429-1434

Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**: 349-352

Gu B, Eick D and Bensaude O (2013) CTD serine-2 plays a critical role in splicing and termination factor recruitment to RNA polymerase II *in vivo*. *Nucleic Acids Research* **41**: 1591-1603

Guidi BW, Bjornsdottir G, Hopkins DC, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Myers LC (2004) Mutual targeting of mediator and the TFIID kinase Kin28. *Journal of biological chemistry* **279**: 29114-29120

Guzder SN, Sung P, Bailly V, Prakash L and Prakash S (1994) RAD25 is a DNA helicase required for DNA repair and RNA polymerase II transcription. *Nature* **369**: 578-581

Ha I, Roberts S, Maldonado E, Sun X, Kim LU, Green M and Reinberg D (1993) Multiple functional domains of human transcription factor IIB: distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. *Genes & Development* **7**: 1021-1032

Hampsey M, Singh BN, Ansari A, Lainé JP and Krishnamurthy S (2011) Control of eukaryotic gene expression: gene loop and transcription machinery. *Advances in enzyme regulation* **51**: 118-125

Handoko L, Xu H, Li G, Ngan CY, Chew E, Schnapp M, Lee CW, Ye C, Ping JL, Mulawadi F, Wong E, Sheng J, Zhang Y, Poh T, Chan CS, Kunarso G, Shahab A, Bourque G, Cacheux-Rataboul V, Sung WK, Ruan Y and Wei CL (2011) CTCF-mediated functional chromatin interactome in pluripotent cells. *Nature Genetics* **43**: 630-638

Hantsche M and Cramer P (2017) Conserved RNA polymerase II initiation complex structure. *Current Opinion in Structural Biology* **47**: 17-22

Harlen KM, Trotta KL, Smith EE, Mosaheb MM, Fuchs SM and Churchman LS (2016) Comprehensive RNA polymerase II interactomes reveal distinct and varied roles for each phospho-CTD residue. *Cell Reports* **15**: 2147-2158

He Y, Fang J, Taatjes DJ and Nogales E (2013) Structural visualization of key steps in human transcription initiation. *Nature* **495**: 481-486

He QL, Titov DV, Li J, Tan M, Ye Z, Zhao Y, Romo D and Liu JO (2015) Covalent modification of a cysteine residue in the XPB subunit of the general transcription factor TFIIH through single epoxide cleavage of the transcription inhibitor triptolide. *Angewandte Chemie* **54**: 1859-1863

He Y, Yan C, Fang J, Inouye C, Tjian R, Ivanov I and Nogales E (2016) Near-atomic resolution visualization of human transcription promoter opening. *Nature* **533**: 359-365

He H, Wang J, and Liu T (2017) UV-Induced RPA1 Acetylation Promotes Nucleotide Excision Repair. *Cell Reports* **20**: 2010-2025

Herr AJ, Jensen MB, Dalmay T and Baulcombe DC (2005) RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* **308**: 118-120

Hilario E, Li Y, Nobumori Y, Liu X and Fan L (2013) Structure of the C-terminal half of human XPB helicase and the impact of the disease-causing mutation XP11BE. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **69**: 237-246

Ho JJ, Cattoglio C, McSwiggen DT, Tjian R and Fong YW (2017) Regulation of DNA demethylation by the XPC DNA repair complex in somatic and pluripotent stem cells. *Genes & Development* **31**: 830-844

Ho JN, Byun SS, Lee S, Oh JJ, Hong SK, Lee SE, Yeon JS (2015) Synergistic antitumor effect of triptolide and cisplatin in cisplatin resistant human bladder cancer cells. *The Journal of Urology* **193**: 1016-1022

Holstege FC, van der Vliet PC and Timmers HT (1996) Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO Journal* **15**: 1666-1677

Hsin JP, Sheth A and Manley JL (2011) RNAP II CTD phosphorylated on threonine-4 is required for histone mRNA 3' end processing. *Science* **334**: 683-686

Hu J, Adar S, Selby CP, Lieb JD and Sancar A (2015) Genome-wide analysis of human global and transcription-coupled excision repair of UV damage at single-nucleotide resolution. *Genes & Development* **29**: 948-960

Iben S, Tschochner H, Bier M, Hoogstraten D, Hozak P, Egly JM and Grummt I (2002) TFIIF plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell* **109**: 297-306

Itin PH, Sarasin A and Pittelkow MR (2001) Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndrome. *Journal of the American Academy of Dermatology* **44**: 891-920

Ito S, Kuraoka I, Chymkowitch P, Compe E, Takedachi A, Ishigami C, Coin F, Egly JM and Tanaka K (2007) XPG stabilizes TFIIF, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Molecular Cell* **26**: 231-243

Janicki SM, Tsukamoto T, Salghetti SE, Tansey WP, Sachidanandam R, Prasanth KV, Ried T, Shav-Tal Y, Bertrand E, Singer RH and Spector DL (2004) From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell* **116**: 683-698

Jawhari A, Lainé JP, Dubaele S, Lamour V, Poterszman A, Coin F, Moras D and Egly JM (2002) p52 mediates XPB function within the transcription/repair factor TFIIF. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 31761-31767

Jenuwein T and Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080

Johnson RE, Kondratik CM, Prakash S and Prakash L (1999) hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science* **285**: 263-265.

Jonkers I and Lis JT (2015) Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**: 167-177

Juven-Gershon T and Kadonaga JT (2010) Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcription machinery. *Developmental Biology* **339**: 225-229

Kadauke S and Blobel GA (2009) Chromatin loops in gene regulation. *Biochimica Biophysica Acta* **1789**: 17-25

Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, Ebmeier CC, Goossens J, Rahl PB, Levine SS, Taatjes DJ, Dekker J and Young RA (2010) Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* **467**: 430-435

- Kainov DE, Vitorino M, Cavarelli J, Poterszman A, Egly JM (2008) Structural basis for group A trichothiodystrophy. *Nature Structural & Molecular Biology* **15**: 980-984
- Kang KA and Hyun JW (2017) Oxidative Stress, Nrf2, and Epigenetic Modification Contribute to Anticancer Drug Resistance. *Toxicological Research* **33**: 1-5
- Kang ME and Dahmus ME (1995) The unique C-terminal domain of RNA polymerase II and its role in transcription. *Advances in Enzymology and Related Areas in Molecular Biology* **71**: 41-77
- Kanno T, Huettel B, Mette MF, Aufsatz W, Jaligot E, Daxinger L, Kreil DP, Matzke M and Matzke AJM (2005) Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics* **37**: 761-765.
- Kershner ESY, Wu SY and Chiang CM (1998) Immunoaffinity purification and functional characterization of human transcription factor IIH and RNA polymerase II from clonal cell lines that conditionally express epitope-tagged subunits of the multiprotein complex. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 34444-34453
- Killeen M, Coulombe B and Greenblatt J (1992) Recombinant TBP, transcription factor IIB, and RAP30 are sufficient for promoter recognition by mammalian RNA polymerase II. *Journal of biological chemistry* **267**: 9463-9466
- Kim YJ, Björklund S, Li Y, Sayre MH and Kornberg RD (1994) A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* **77**: 599-608
- Kim M, Suh H, Cho EJ and Buratowski S (2009) Phosphorylation of the yeast Rpb1 C-terminal domain at serines 2, 5 and 7. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 26421-26426
- Kim KT, Ebricht RH and Reinberg D (2000) Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIH. *Science* **288**: 1418-1422
- Kim JS, Saint-André C, Lim HS, Hwang CS, Egly JM and Cho Y (2015) Crystal structure of the Rad3/XPD regulatory domain of Ssl1/p44. *Journal of Biological Chemistry* **290**: 8321-8330
- Kimura A, Matsubara K and Horikoshi M (2005) A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **138**: 647-662
- Kornberg RD (1999) Eukaryotic transcriptional control. *Trends in Cell Biology* **9**: 46-49
- Kouzarides T (2007) SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell* **131**: 822
- Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD and Lambert WC (1994) The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Archives of Dermatology* **130**: 1018-1021

Krebs AR, Karmodiya K, Lindahl-Allen M, Struhl K and Tora L (2011) SAGA and ATAC histone acetyl transferase complexes regulate distinct sets of 167 genes and ATAC defines a class of p300-independent enhancers. *Molecular Cell* **44**: 410-423

Krivega I and Dean A (2012) Enhancer and promoter interactions-long distance calls. *Current Opinion in Genetics & Development* **22**: 79-85

Kuehner JN, Pearson EL and Moore C (2011) Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**: 283-294

Kwiatkowski N, Zhang T, Rahl PB, Abraham BJ, Reddy J, Ficarro SB, Dastur A, Amzallag A, Ramaswamy S, Tesar B, Jenkins CE, Hannett NM, McMillin D, Sanda T, Sim T, Kim ND, Look T, Mitsiades CS, Weng AP, Brown JR, Benes CH, Marto JA, Young RA and Gray NS (2014) Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature* **511**: 616-620

Kuschal C, Botta E, Orioli D, Digiovanna JJ, Seneca S, Keymolen K, Tamura D, Heller E, Khan SG, Caligiuri G, Lanzafame M, Nardo T, Ricotti R, Peverali FA, Stephens R, Zhao Y, Lehmann AR, Baranello L, Levens D, Kraemer KH and Stefanini M (2016) GTF2E2 mutations destabilize the general transcription factor complex TFIIE in individuals with DNA repair-proficient trichothiodystrophy. *American Journal of Human Genetics* **98**: 627-642

Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H, Reinberg D and Ebricht RH (1998) New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes & Development* **12**: 34-44

Lainé JP, Singh BN, Krishnamurthy S and Hampsey M (2009) A physiological role for gene loops in yeast. *Genes & Development* **23**: 2604-2609

Larochelle S, Amat R, Glover-Cutter K, Sansó M, Zhang C, Allen JJ, Shokat KM, Bentley DL and Fisher RP (2012) Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**: 1108-1115

Lassadi I and Bystricky K (2011) Tracking of single and multiple genomic loci in living yeast cells. *Methods in Molecular Biology* **745**: 499-522

Lavigne AC, Mengus G, Gangloff YG, Wurtz JM and Davidson I (1999) Human TAF(II)55 interacts with the vitamin D(3) and thyroid hormone receptors and with derivatives of the retinoid X receptor that have altered transactivation properties. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 5486-5494

Lee DK, DeJong J, Hashimoto S, Horikoshi M and Roeder RG (1992) TFIIA induces conformational changes in TFIID via interactions with the basic repeat. *Molecular and Cellular Biology* **12**: 5189-5196

Lee DH, Gershenzon N, Gupta M, Ioshikhes IP, Reinberg D and Lewis BA (2005) Functional characterization of core promoter elements: the downstream core element is recognized by TAF1. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 9674-9686

Legastelois R, Jeanblanc J, Vilpoux C, Bourguet E and Naassila M (2017) Mécanismes épigénétiques et troubles de l'usage d'alcool : une cible thérapeutique intéressante ? *Biologie Aujourd'hui* **211** : 83-91

Le May N, Egly JM and Coin F (2010a) True lies: the double life of the nucleotide excision repair factors in transcription and DNA repair. *Journal of Nucleic Acids* 616342

Le May N, Mota-Fernandes D, Vélez-Cruz R, Iltis I, Biard D and Egly JM (2010b) NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. *Molecular Cell* **38**: 54-66

Le May N, Fradlin D, Iltis I, Bougnères P and Egly JM (2012) XPG and XPF endonucleases trigger chromatin looping and DNA methylation for accurate expression of activated genes. *Molecular Cell* **47**: 622-632

Lewis BA, Kim TK and Orkin SH (2000) A downstream element in the human beta-globin promoter: evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 7172-7177

Li Y, Flanagan PM, Tschochner H and Kornberg RD (1994) RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* **263**: 805-807

Lin YC, Choi WS and Gralla JD (2005) TFIIF XPB mutants suggest a unified bacterial-like mechanism for promoter opening but not escape. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**: 603-607

Lindenbaum Y, Dickson D, Rosenbaum P, Kraemer K, Robbins I and Rapin I (2001) Xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome complex: first neuropathological study and review of eight other cases. *European Journal of Paediatric Neurology* **5**: 225-242

Lu H, Flores O, Weinmann R and Reinberg D (1991) The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**: 10004-10008

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF and Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251-260

Luijsterburg MS, Lindh M, Acs K, Vrouwe MG, Pines A, van Attikum H, Mullenders LH and Dantuma NP (2012) DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *Journal of Cell Biology* **197**: 267-281

Ma L, Siemssen ED, Noteborn HM and van der Eb AJ (1994a) The xeroderma pigmentosum group B protein ERCC3 produced in the baculovirus system exhibits DNA helicase activity. *Nucleic Acids Research* **22**: 4095-4102.

Ma L, Westbroek A, Jochemsen AG, Weeda G, Bosh A, Bootsma D, Hoeijmakers JH and van der Eb AJ (1994b) Mutational analysis of ERCC3, which is involved in DNA repair and

transcription initiation: identification of domains essential for the DNA repair function. *Molecular and Cellular Biology* **14**: 4126-4134

Ma X, Hong Y, Han W, Sheng D, Ni J, Hou G and Shen Y (2011) Single-stranded DNA binding activity of XPBI, but not XPBII, from *Sulfolobus tokodaii* causes double-stranded DNA melting. *Extremophiles* **15**: 67-76

Maeshima K, Ide S and Babokhov M (2019) Dynamic chromatin organization without the 30-nm fiber. *Current Opinion in Cell Biology* **58**: 95-104

Maldonado E, Ha I, Cortes P, Weis L and Reinberg D (1990) Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of a transcription-competent complex. *Molecular and Cellular Biology* **10**: 6335-6347

Malik S and Roeder RG (2000) Transcriptional regulation through mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends in Biochemical Sciences* **25**: 277-283

Manandhar M, Lowery MG, Boulware KS, Lin KH, Lu Y and Wood RD (2017) Transcriptional consequences of XPA disruption in human cell lines. *DNA repair* **57**: 76-90

Mangelsdorf DJ and Evans RM (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**: 841-850

Masui O, Bonnet I, Le Baccon P, Brito I, Pollex T, Murphy N, Hupe P, Barillot E, Belmont AS and Heard E (2011) Live-cell chromosome dynamics and outcome of X chromosome pairing events during ES cell differentiation. *Cell* **145**: 447-458

Masutani C, Sugasawa K, Yanagisawa J, Sonoyama T, Ui M, Enomoto T, Takio K, Tanaka K, van der Spek PJ and Bootsma D (1994) Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *EMBO Journal* **13**: 1831-1843

Mathieu N, Kaczmarek N and Naegeli H (2010) Strand- and site-specific DNA lesion demarcation by the XP group D helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**: 17545-17550

Maxon ME, Goodrich JA and Tjian R (1994) Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIF: a model for promoter clearance. *Genes & Development* **8**: 515-524

Meister P, Gehlen LR, Varela E, Kalck V and Gasser SM (2010) Visualizing yeast chromosomes and nuclear architecture. *Methods Enzymology* **470**: 535-567

Miller G and Hahn S (2006) A DNA-tethered cleavage probe reveals the path for promoter DNA in the yeast preinitiation complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**: 603-610

- Mine-Hattab J and Rothstein R (2012) Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nature Cell Biology* **14**: 510-517
- Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T, Nakatani Y and Allis CD (1996) The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**: 1261-1270
- Mocquet V, Kropachev K, Kolbanovskiy M, Kolbanovskiy A, Tapias A, Cai Y, Broyde S, Geacintov NE and Egly JM (2007) The human DNA repair factor XPC-HR23B distinguishes stereoisomeric benzo[a]pyrenyl-DNA lesions. *EMBO Journal* **26**: 2923-2932
- Modi S, Kir D, Giri B, Majumder K, Arora N, Dudeja V, Banerjee S and Saluja AK (2016) Minnelide overcomes oxaliplatin resistance by downregulating the DNA repair pathway in pancreatic cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery* **20**: 13-23 (discussion 23-14)
- Moser J, Kool H, Giakzidis I, Caldecott K, Mullenders LHF and Foustieri MI (2007) Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Molecular Cell* **27**: 311-323
- Murakami K, Tsai KL, Kalisman N, Bushnell DA, Asturias FJ and Kornberg RD (2015) Structure of an RNA polymerase II preinitiation complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **112**: 13543-13548
- Murphy MN, Gong P, Ralto K, Manelyte L, Savery NJ and Theis K (2009) An N-terminal clamp restrains the motor domains of the bacterial transcription-repair coupling factor Mfd. *Nucleic Acids Research* **37**: 6042-6053
- Nagy Z, Riss A, Fujiyama S, Krebs A, Orpinell M, Jansen P, Cohen A, Stunnenberg HG, Kato S and Tora L (2010) The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**: 611-628
- Nance MA and Berry SA (1992) Cockayne syndrome: review of 140 cases. *American Journal of Medical Genetics* **42**: 68-84
- Narita T, Narita K, Takedachi A, Saijo M and Tanaka K (2015) Regulation of transcription elongation by the XPG-TFIIH complex is implicated in Cockayne syndrome. *Molecular and Cellular Biology* **35**: 3178-3188
- Nemec CM, Yang F, Gilmore JM, Hintermair C, Ho YH, Tseng SC, Heidemann M, Zhang Y, Florens L, Gasch AP, Eick D, Washburn MP, Varani G and Ansari AZ (2017) Different phosphoisoforms of RNA polymerase II engage the Rtt103 termination factor in a structurally analogous manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **114**: 3944-3953
- Nemec CM, Singh AK, Ali A, Tseng SC, Syal K, Ringelberg KJ, Ho YH, Hintermair C, Ahmad MF, Kar RK, Gasch AP, Akhtar MS, Eick D and Ansari AZ (2018) Noncanonical CTD kinases regulate RNA polymerase II in a gene-class-specific manner. *Nature Chemical Biology* **15**: 123-131

Ng D, Pitcher GM, Szilard RK, Kanisek M, Clapcote SJ, Lipina T, Kalia LV, Joo D, McKerlie C, Cortez M, Roder JC, Salter MW and McInnes RR (2009) Neto1 is a novel CUB-domain NMDA receptor-interacting protein required for synaptic plasticity and learning. *Plos Biology* **7**: e41

Nikolov DB, Hu SH, Lin J, Gasch A, Hoffmann A, Horikoshi M, Chua NH, Roeder RG and Burley SK (1992) Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature* **360**: 40-46

Nishi R, Okuda Y, Watanabe E, Mori T, Iwai S, Masutani C, Sugasawa K and Hanaoka F (2005) Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 5664-5674

Ohkuma Y, Sumimoto H, Hoffman A, Shimasaki S, Horikoshi M and Roeder RG (1991) Structural motif and potential sigma homologies in the large subunit of human general transcription factor TFIIE. *Nature* **354**: 398-401

Ohkuma Y and Roeder RG (1994) Regulation of TFIIH ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation. *Nature* **368**: 160-163

Ohler U, Liao G, Niemann H and Rubin GM (2002) Computational analysis of core promoters in the Drosophila genome. *Genome Biology* **3**: RESEARCH0087

Oksenyich V and Coin F (2010) The long unwinding road XPB and XPD helicases in damaged DNA opening. *Cell cycle* **9**: 90-96

Oksenyich V, Bernades de Jesus B, Zhovmer A, Egly JM and Coin F (2009) Molecular insights into the recruitment of TFIIH to sites of DNA damage. *EMBO Journal* **28**: 2971-2980

Okuda M, Tanaka A, Arai Y, Satoh M, Okamura H, Nagadoi A, Hanaoka F, Ohkuma Y and Nishimura Y (2004) A novel zinc finger structure in the large subunit of human general transcription factor TFIIE. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 51395-51403

Onodera Y, Haag JR, Ream T, Costa Nunes P, Pontes O and Pikaard CS (2005) Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* **120**: 613-622

O'Sullivan JM, Tan-Wong SM, Morillon A, Lee B, Coles J, Mellor J and Proudfoot NJ (2004) Gene loops juxtapose promoters and terminators in yeast. *Nature Genetics* **36**: 1014-1018

Ou H, Phan S, Deerinck T, Thor A, Ellisman M and O'Shea C (2017) ChromEAT: visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science* **357**: 6349

Park JS, Marr MT and Roberts JW (2002) *E. coli* transcription repair coupling factor (Mfd protein) rescues arrested complexes by promoting forward translocation. *Cell* **109**: 757-767

Pham AD and Sauer F (2000) Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in Drosophila. *Science* **289**: 2357-2360

Plaschka C, Hantsche M, Dienemann C, Burzinski C, Plitzko J and Cramer P (2016) Transcription initiation complex structures elucidate DNA opening. *Nature* **533**: 353-358

Pollitt RJ, Jenner FA and Davies M (1968) Sibs with mental and physical retardation and trichorrhexis nodosa with abnormal amino acid composition of the hair. *Archives of Disease in Childhood* **43**: 211-216

Poss ZC, Ebmeier CC and Taatjes DJ (2013) The mediator complex and transcription regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **48**: 575-608

Price VH, Odom RB, Ward WH and Jones FT (1980) Trichothiodystrophy: sulfur-deficient brittle hair as a marker for neuroectodermal symptom complex. *Archives of Dermatology* **116**: 1375-1384

Rapin I (2013) Disorders of nucleotide excision repair. *Handbook of clinical neurology* **113**: 1637-1650

Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD and Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593-599

Reardon JT and Sancar A (2003) Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease. *Genes & Development* **17**: 2539-2551

Reddy KL, Zullo JM, Bertolino E and Singh H (2008) Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* **452**: 243-247

Riedl T, Hanaoka F and Egly JM (2003) The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO Journal* **22**: 5293-5303

Riou L, Zeng L, Chevallier-Lagente O, Sary A, Nikaido O, Taïeb A, Weeda G, Mezzina M and Sarasin A (1999) The relative expression of mutated XPB gene results in xeroderma pigmentosum/Cockayne's syndrome or trichothiodystrophy cellular phenotypes. *Human Molecular Genetics* **8**: 1125-1133

Riss A, Scheer E, Joint M, Trowitzsch S, Berger I and Tora L (2015) Subunits of ADA-two-A-containing (ATAC) or Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase (SAGA) coactivator complexes enhance the acetyltransferase activity of GCN5. *Journal of Biological Chemistry* **290**: 28997-29009

Robinett CC, Straight A, Li G, Willhelm C, Sudlow G, Murray A and Belmont AS (1996) In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *Journal of Cell Biology* **135**: 1685-1700

Robinson PJ, Bushnell DA, Trnka MJ, Burlingame AL and Kornberg RD (2012) Structure of the mediator head module bound to the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **109**: 17931-17935

- Robinson PJ, Fairall L, Huynh VA and Rhodes D (2006) EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**: 6506-6511
- Rodríguez-Navarro S (2009) Insights into SAGA function during gene expression. *EMBO Reports* **10**: 843-850
- Roeder RG and Rutter WJ (1969) Multiple Forms of DNA-dependent RNA Polymerase in Eukaryotic Organisms. *Nature* **224**: 234-237.
- Rossignol M, Kolb-Cheynel I and Egly JM (1997) Substrate specificity of the cdk-activating kinase (CAK) is altered upon association with TFIIH. *EMBO Journal* **16**: 1628-1637
- Rouillon C and White MF (2011) The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins. *Research in Microbiology* **162**: 19-26
- Roukos V, Voss TC, Schmidt CK, Lee S, Wangsa D and Misteli T (2013) Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. *Science* **341**: 660-664
- Roy R, Adamczewski JP, Seroz T, Vermeulen W, Tassan JP, Schaeffer L, Nigg EA, Hoeijmakers JH and Egly JM (1994) The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell* **79**: 1093-1101
- Sadler JR, Sasmor H and Betz JL (1983) A perfectly symmetric lac operator binds the lac repressor very tightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **80**: 6785-6789
- Sainsbury S, Bernecky C and Cramer P (2015) Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**: 129-143
- Saiz L, Rubi JM and Vilar JMG (2005) Inferring the in vivo looping properties of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**: 17642-17645
- Sanchez R and Zhou MM (2009) The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* **12**: 659-665
- Sandoz J, Nagy Z, Catez P, Caliskan G, Geny S, Renaud JB, Concordet JP, Poterszman A, Tora L, Egly JM, Le May N and Coin F (2019) Functional interplay between TFIIH and KAT2A regulates higher-order chromatin structure and class II gene expression. *Nature Communications* **10**: 1288
- Sandrock B and Egly JM (2001) A yeast four-hybrid system identifies Cdk-activating kinase as a regulator of the XPD helicase, a subunit of transcription factor IIH. *Journal of biological chemistry* **276**: 35328-35333
- Schaeffer L, Roy R, Humbert S, Moncollin V, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, Chambon P and Egly JM (1993) DNA repair helicase: A component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* **260**: 58-63.

Schneider J, Wood A, Lee JS, Schuster R, Dueker J, Maguire C, Swanson SK, Florens L, Washburn MP and Shilatifard A (2005) Molecular regulation of histone H3 trimethylation by COMPASS and the regulation of gene expression. *Molecular Cell* **19**: 849-856

Schilbach S, Hantsche M, Tegunov D, Dienemann C, Wigge C, Urlaub H and Cramer P (2017) Structures of transcription pre-initiation complex with TFIID and Mediator. *Nature* **551**: 204-209

Schroeder SC, Schwer B, Shuman S and Bentley D (2000) Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes & Development* **14**: 2435-2440

Schultz P, fribourg S, Poterszman A, Mallouh V, Moras D and Egly JM (2000) Molecular structure of human TFIID. *Cell* **102**: 599-607

Schwertman P, Vermeulen W and Marteijn JA (2013) UVSSA and USP7, a new couple in transcription-coupled DNA repair. *Chromosoma* **122**: 275-284

Scott RJ, Itin P, Kleijer WJ, Kolb K, Arlett C and Muller H (1993) Xeroderma pigmentosum-Cockayne syndrome complex in two patients: absence of skin tumors despite severe deficiency of DNA excision repair. *Journal of the American Academy of Dermatology* **29**: 883-889

Shandilya J and Roberts SG (2012) The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochimica et Biophysica Acta* **1819**: 391-400

Shao H, Revach M, Moshonov S, Tzuman Y, Gazit K, Albeck S, Unger T and Dikstein R (2005) Core promoter binding by histone-like TAF complexes. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 206-219

Serizawa H, Conaway JW and Conaway RC (1993) Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription. *Nature* **363**: 371-374

Sims RJ, Mandal SS and Reinberg D (2004) Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Current Opinion in Cell Biology* **16**: 263-271

Singh A, Compe E, Le May N and Egly JM (2015) TFIID subunit alterations causing xeroderma pigmentosum and tichothiodystrophy specifically disturb several steps during transcription. *American Journal of Human Genetics* **96**: 194-207

Smale ST and Konaga JT (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annual review of biochemistry* **72**: 449-479

Smith AJ, Pernstich C and Savery NJ (2012) Multipartite control of the DNA translocase, Mfd. *Nucleic acid research* **40**: 10408-10416

Spotswood HT and Turner BM (2002) An increasingly complex code. *Journal of Clinical Investigation* **110**: 577-582

Stadler MB, Murr R, Burger L, Ivanek R, Lienert F, Schöler A, van Nimwegen E, Wirbelauer C, Oakeley EJ, Gaidatzis D, Tiwari VK and Schübeler D (2011) DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature* **480**: 490-495

Stargell LA, Ogg RC, Adkins JN, Robinson MM and Lumb KJ (2001) Transcriptional activity of the TFIIA four-helix bundle *in vivo*. *Proteins* **43**: 227-232

Stefanini M, Lagomarsini P, Arlett CF, Marinoni S, Borrone C, Crovato F, Trevisan G, Cordone G and Nuzzo F (1986) Xeroderma pigmentosum (complementation group D) mutation is present in patients affected with trichothiodystrophy with photosensitivity. *Human Genetics* **74**: 107-112

Sugasawa K, Okamoto T, Shimizu Y, Masutani C, Iwai S and Hanaoka F (2001) A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes & Development* **15**: 507-521

Sung P, Bailly V, Weber C, Thompson LH, Prakash L and Prakash S (1993) Human Xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase. *Nature* **365**: 852-855

Sung P, Higgins D, Prakash L and Prakash S (1988) Mutation of lysine-48 to arginine in the yeast RAD3 protein abolishes its ATPase and DNA helicase activities but not the ability to bind ATP. *EMBO Journal* **7**: 3263-3269

Takagi Y, Masuda CA, Chang WH, Komori H, Wang D, Hunter T, Joazeiro CA, Kornberg RD (2005) Ubiquitin ligase activity of TFIIH and the transcriptional response to DNA damage. *Molecular Cell* **18**: 237-243

Tan S, Aso T, Conaway RC and Conaway JW (1994) Roles for both the RAP30 and RAP74 subunits of transcription factor IIF in transcription initiation and elongation by RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 25684-25691

Tanaka A, Watanabe T, Iida Y, Hanaoka F and Ohkuma Y (2009) Central forkhead domain of human TFIIE beta plays a primary role in binding double-stranded DNA at transcription initiation. *Genes to Cells* **14**: 395-405

Tan-Wong SM, French JD, Proudfoot NJ and Brown MA (2008) Dynamic interactions between the promoter and terminator regions of the mammalian BRCA1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**: 5160-5165

Thaler F and Mercurio C (2014) Towards selective inhibition of histone deacetylase isoforms: what has been achieved, where we are and what will be next. *ChemMedChem* **9**: 523-526

Titov DV, Gilman B, He QL, Bhat S, Low WK, Dang Y, Smeaton M, Demain AL, Miller PS, Kugel JF, Goodrich JA and Liu JO (2011) XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. *Nature Chemical Biology* **7**: 182-188.

Traboulsi H, Davoli S, Catez P, Egly JM and Compe E (2014) Dynamic partnership between TFIIH, PGC-1 α and SIRT1 is impaired in trichothiodystrophy. *PLoS Genetics* **10**: e1004732

Ueda M, Matsuura K, Kawai H, Wakasugi M and Matsunaga T (2019) Spironolactone-induced XPB degradation depends on CDK7 kinase and SCF^{FBXL18} E3 ligase. *Genes to Cells* **24**: 284-296

van den Boom V, Citterio E, Hoogstraten D, Zotter A, Egly JM, van Cappellen WA, Hoeijmakers JHJ, Houtsmuller AB and Vermeulen W (2004) DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. *Journal of Cell Biology* **166**: 27-36

Vernimmen D, De Gobbi M, Sloane-Stanley JA, Wood WG and Higgs DR (2007) Long-range chromosomal interactions regulate the timing of the transition between poised and active gene expression. *EMBO Journal* **26**: 2041-2051

Verschure PJ, van der Kraan I, de Leeuw W, van der Vlag J, Carpenter AE, Belmont AS and van Driel R (2005) *In vivo* HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 4552-4564

Volker M, Moné MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, van Driel R, van Zeeland AA and Mullenders LH (2001) Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors *in vivo*. *Molecular Cell* **8**: 213-224

Wang Y, Fairley JA and Roberts SG (2010) Phosphorylation of TFIIB links transcription initiation and termination. *Current biology* **20**: 548-553

Wang Y, Zhang T, Kwiatkowski N, Abraham BJ, Lee TI, Xie S, Yuzugullu H, Von T, Li H, Lin Z, Stover DG, Lim E, Wang ZC, Iglehart JD, Young RA, Gray NS, Zhao JJ (2015) CDK7-dependent transcriptional addiction in triple-negative breast cancer. *Cell* **163**: 174-186

Watanabe T, Hayashi K, Tanaka A, Furumoto T, Hanaoka F and Ohkuma Y (2003) The carboxy terminus of the small subunit of TFIIE regulates the transition from transcription initiation to elongation by RNA polymerase II. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 2914-2926

Watt F and Molloy PL (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes & Development* **2**: 1136-1143

Weeda G, van Ham R, Masurel R, Westerveld A, Odijk H, de Wit J, Bootsma D, van der Eb AJ and Hoeijmakers JH (1990a) Molecular cloning and biological characterization of the human excision repair gene ERCC-3. *Molecular and Cellular Biology* **10**: 2570-2581

Weeda G, van Ham RC, Vermeulen W, Bootsma D, van der Eb AJ and Hoeijmakers JH (1990b) A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Cell* **62**: 777-791.

Weeda G, Eveno E, Donker I, Vermeulen W, Chevallier-Lagente O, Taïeb A, Stary A, Hoeijmakers JH, Mezzina M and Sarasin A (1997) A mutation in the XPB/ERCC3 DNA repair transcription gene, associated with trichothiodystrophy. *American Journal of Human Genetics* **60**: 320-329

Weber AR, Krawczyk C, Robertson AB, Kuśnierczyk A, Vågbø CB, Schuermann D, Klungland A and Schär P (2016) Biochemical reconstitution of TET1-TDG-BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism. *Nature Communications* **7**: 10806

Weintraub AS, Li CH, Zamudio AV, Sigova AA, Hannett NM, Day DS, Abraham BJ, Cohen MA, Nabet B, Buckley DL, Guo YE, Hnisz D, Jaenisch R, Bradner JE, Gray NS and Young RA (2017) YY1 Is a structural regulator of enhancer-promoter loops. *Cell* **171**: 1573-1588

Westover KD, Bushnell DA and Kornberg RD (2004) Structural basis of transcription: separation of RNA from DNA by RNA polymerase II. *Science* **303**: 1014-1016

Wild T and Cramer P (2012) Biogenesis of multisubunit RNA polymerases. *Trends in Biochemical Sciences* **37**: 99-105

Wind M and Reines D (2000) Transcription elongation factor SII. *Bioessays* **22**: 327-336

Wong KH, Jin Y and Struhl K (2014) TFIIF phosphorylation of the Pol II CTD stimulates mediator dissociation from the preinitiation complex and promoter escape. *Molecular Cell* **54**: 601-612

Woodcock CL and Dimitrov S (2001) Higher-order chromatin and chromosomes. *Current opinion in genetics & development* **11**: 130-135

Woychik NA and Young RA (1990) RNA polymerase II: subunit structure and function. *Trends in Biochemical Sciences* **15**: 347-351

Wu CH, Yamaguchi Y, Benjamin LR, Horvat-Gordon M, Washinsky J, Enerly E, Larsson J, Lambertsson A, Handa H and Gilmour D (2003) NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila*. *Genes & development* **17**: 1402-1414

Yan Q, Moreland RJ, Conaway JW and Conaway RC (1999) Dual roles for transcription factor IIF in promoter escape by RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 35668-35675

Yan C, Dodd T, He Y, Tainer JA, Tsutakawa SE and Ivanov I (2019) Transcription preinitiation complex structure and dynamics provide insight into genetic diseases. *Nature structural & molecular biology* **26**: 397-406

Yamada T, Yamagushi Y, Inukai N, Okamoto S, Mura T and Handa H (2006) P-Tefb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Molecular Cell* **21**: 227-237

Yu Y, Song C, Zhang Q, DiMaggio PA, Garcia BA, York A, Carey MF and Grunstein M (2012) Histone H3 lysine 56 methylation regulates DNA replication through its interaction with PCNA. *Molecular Cell* **46**: 7-17

Zeng M, Kwiatkowski NP, Zhang T, Nabet B, Xu M, Liang Y, Quan C, Wang J, Hao M, Palakurthi S, Zhou S, Zeng Q, Kirschmeier PT, Meghani K, Leggett AL, Qi J, Shapiro GI, Liu JF,

Matulonis UA, Lin CY, Konstantinopoulos PA and Gray NS (2018) Targeting MYC dependency in ovarian cancer through inhibition of CDK7 and CDK12/13. *ELife* **7**: e39030

Zhang C and Burton ZF (2004) Transcription factors IIF and IIS and nucleoside triphosphate substrates as dynamic probes of the human RNA polymerase II mechanism. *Journal of Molecular Biology* **342**: 1085-1099

Zhao R, Nakamura T, Fu Y, Lazar Z and Spector DL (2011) Gene bookmarking accelerates the kinetics of post-mitotic transcriptional re-activation. *Nature Cell Biology* **13**: 1295-1304

Zhao X and Herr W (2002) A regulated two-step mechanism of TBP binding to DNA: a solvent-exposed surface of TBP inhibits TATA box recognition. *Cell* **108**: 615-627

Zhao M, Geng R, Guo X, Yuan R, Zhou X, Zhong Y, Huo Y, Zhou M, Shen Q, Li Y, Zhu W and Wang J (2017) PCAF/GCN5-Mediated Acetylation of RPA1 Promotes Nucleotide Excision Repair. *Cell Reports* **20**: 1997-2009

Zhong YY, Chen HP, Tan BZ, Yu HH and Huang XS (2013) Triptolide avoids cisplatin resistance and induces apoptosis via the reactive oxygen species/nuclear factor-kappaB pathway in SKOV3(PT) platinum-resistant human ovarian cancer cells. *Oncology Letters* **6**: 1084-1092

Zhou M, Halanski MA, Radonovich MF, Kashanchi F, Peng J, Price DH and Brady JN (2000) Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 5077-5086

Ziani S, Nagy Z, Alekseev S, Soutoglou E, Egly JM and Coin F (2014) Sequential and ordered assembly of a large DNA repair complex on undamaged chromatin. *Journal of Cell Biology* **206**: 589-598

Rôles de TFIIH dans l'ouverture du promoteur et le remodelage de la chromatine lors de la transcription des gènes de classe II

La synthèse des ARN messagers est un processus hautement régulé. Pendant l'initiation de la transcription, un nombre important de protéines est recruté au niveau du promoteur des gènes, comprenant l'ARN polymérase II, les facteurs généraux de transcription comme TFIIH, des co-activateurs et des remodeleurs de la chromatine. L'assemblage du complexe de pré-initiation sur les promoteurs est suivi par leur ouverture. Les modèles acceptés à ce jour suggéraient que la transcription des gènes de classe II nécessite les activités ATPase et hélicase de la sous-unité XPB de TFIIH afin d'ouvrir le promoteur. Or nous avons observé que l'expression des ARNm s'accommode de l'absence de XPB mais nécessite son activité ATPase. Ces observations concordent avec un modèle alternatif dans lequel l'activité ATPase de XPB est utilisée pour transloquer la protéine en amont du site d'initiation et lever un blocage, imposé par la présence de XPB, de l'ouverture du promoteur. De plus, nous avons découvert un nouveau rôle de TFIIH dans le remodelage de la chromatine lors de l'initiation de la transcription. Nous avons mis en évidence un lien étroit entre TFIIH et l'histone acétyltransférase KAT2A, permettant le contrôle de la structure de la chromatine et l'expression des gènes, apportant en outre de nouvelles informations sur le *Xeroderma pigmentosum* combiné au syndrome de Cockayne, une maladie de la réparation avec une prédisposition au cancer.

The synthesis of messenger RNA is a highly regulated process. During transcription initiation, a large number of proteins are recruited to gene promoter including RNA polymerase II, general transcription factors like TFIIH, co-activators and chromatin remodelers. The assembly of pre-initiation complex on promoters is followed by their opening. Accepted models to date suggested that transcription of class II genes requires TFIIH XPB subunit ATPase and helicase activities to actively open the promoter. However, we have observed that mRNA expression is compatible with the absence of XPB but requires its ATPase activity. These observations are consistent with an alternative model in which the ATPase activity of XPB is used to translocate the protein upstream of the initiation site, alleviating a block, imposed by the presence of XPB, of the promoter opening. Moreover, we found a new role for TFIIH in chromatin remodeling during transcription initiation. We highlighted a tight connection between TFIIH and the histone acetyltransferase KAT2A that controls higher-order chromatin structure and gene expression and provide new insights into transcriptional misregulation in combined *Xeroderma Pigmentosum* and Cockayne syndrome, a cancer-prone DNA repair-deficient disorder.