

Université de Montréal

Taf14 : un cofacteur de transcription impliqué dans l'activation de la transcription de
Imp2: un gène nécessaire pour la résistance à la bléomycine chez la levure
Saccharomyces cerevisiae

Par
Mohamed Aoulad Aissa

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

juin 2006

© Mohamed Aoulad Aissa, 2004



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Taf14 : un cofacteur de transcription impliqué dans l'activation de la transcription de
Imp2 : un gène nécessaire pour la résistance à la bléomycine chez la levure
Saccharomyces cerevisiae

Présenté par
Mohamed Aoulad Aissa

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Robert, François

Président rapporteur

Dr Dindial Ramotar
Directeur de recherche

Dr Manuela Santos
Membre du jury

RÉSUMÉ

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Imp2 est un activateur de transcription qui contrôle la réponse cellulaire dans les conditions de stress. Les mutants Imp2 sont hypersensibles aux agents oxydant endommageant l'ADN, tels que la bléomycine, le peroxyde d'hydrogène et les ions monovalents et divalents. Dans les conditions de stress oxydatif, il n'y a pas de changement dans le niveau d'expression de l'ARNm d'*IMP2*. Aussi la surproduction de la protéine Imp2 n'augmente pas la résistance aux agents oxydants l'ADN. Une expression constitutive de *IMP2* est suffisante pour avoir un rôle biologique. Le gène *IMP2* est sous le contrôle d'un promoteur IPE (*IMP2* promoter element). Cependant nous ne connaissons pas le facteur de transcription qui interagit avec ce promoteur. Dans cette étude, nous montrons que le facteur de transcription Taf14 est impliqué dans l'activation de la transcription de *IMP2*. Nos résultats montrent que, dans des conditions de stress oxydant, les mutants Taf14 ont les mêmes phénotypes que les mutants Imp2. L'expression de *IMP2* est sous le contrôle de Taf14, cependant Taf14 ne se fixe pas sur la région promotrice du gène *IMP2*. Il semble que Taf14 active la transcription de *IMP2* par des interactions protéine protéine.

Mots-clés : *IMP2*, Taf14, TFIID, BLM, Transcription, ARNpolymérase, Stress, promoteur.

ABSTRACT

Imp2 is a transcriptional activator that controls several stress responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Imp2 mutants are hypersensitive to oxidative DNA damaging agents, such as bleomycin and hydrogen peroxide, as well as to monovalent and divalent ions. These stress conditions do not modulate *IMP2* mRNA expression levels, nor does Imp2 overproduction enhance resistance to either oxidants or salts, demonstrating that constitutive expression of Imp2 is sufficient for its biological roles. *IMP2* is under the control of a promoter element designated IPE. However, the factors that are associated with this promoter element are not yet known. In this study, we show that Taf14 is involved in transcriptional activation of *IMP2*. Our results show that Taf14 deficient mutant displays the same phenotypes as *imp2Δ* null mutants under various stress conditions. Our results also show that the expression of the *IMP2* gene is under the control of the transcription factor Taf14. However, Taf14 does not bind to the *IMP2* gene promoter. We suggest that Taf14 could activate transcription of *IMP2* gene by protein-protein interactions.

Key words: *IMP2*, Taf14, TFIID, BLM, Transcription, ARN polymerase, Stress, Promoter.

Tables des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XV
REMERCIEMENTS.....	XVII
I- Introduction.....	1
1 Régulation de la transcription des gènes chez les eucaryotes.....	2
1-1 Les promoteurs.....	4
1-1-1 Promoteur de base.....	5
1-1-2 Éléments activateurs communs.....	6
1-1-3 Éléments activateurs spécifiques.....	6
1-2 Les ARN polymérases.....	6
1-2-1 L'ARN polymérase I.....	6
1-2-2 L'ARN polymérase III.....	7
1-2-3 L'ARN polymérase II.....	7
1-3 L'appareil de transcription de base.....	8
1-4 Les facteurs de transcription.....	9
2. La famille des Tafs (TBP-Associated Factors).....	10
2-1 Les propriétés biochimiques des Tafs.....	11
2-2 Fonction des TAFs dans la transcription.....	13
2-3 Rôle des TAFs dans la modification de la chromatine.....	14
2-3-1 La modification de la chromatine.....	14

2-3-2	Activité catalytique des Tafs.....	17
3.	Taf 14	19
3-1	TAF14 et la morphogenèse cellulaire.....	19
3-1-1	Le rôle des filaments de l'actine.....	19
3-1-2	Taf14 et le fonctionnement de l'actine.....	20
3-2	Taf14 fait partie du complexe SWI/SNF.....	21
3-3	Taf14 et le complexe TFIIF.....	22
3-4	Taf14: un homologue de Af-9/Enl chez l'humain.....	23
4.	Les facteurs de transcription YAP	24
4-1	Le stress oxydant.....	24
4-2	La réponse cellulaire au stress.....	25
4-3	YAP1 et la régulation du stress oxydant.....	25
4-4	Le promoteur de YAP1.....	26
5.	Imp2	27
4-5	Le promoteur d' <i>IMP2</i>	27
4-6	Structure d'Imp2.....	28
4-7	Fonction d'Imp2.....	29
5-3-1	Imp2 et la régulation du métabolisme des glucides.....	29
5-3-2	Imp2 et la régulation du stress cellulaire.....	29
•	Imp2 et la résistance à la BLM.....	30
•	Imp2 et l'équilibre ionique	30
•	Imp2 et le stress thermique.....	31
•	L'importance de Imp2.....	33
6.	La bléomycine	34
6-1	La structure.....	34
6-2	L'effet toxique de la BLM.....	35
6-3	BLM: un médicament antitumoral.....	36

6-4	La résistance à la BLM.....	37
7.	Problématique et but de mon projet de recherche.....	38
7-1	Problématique et objectifs.....	38
7-2	La stratégie.....	38
II-	Matériel et Méthode.....	40
1.	Les souches utilisées.....	41
1-1	Souches de levures.....	41
1-2	Souches de bactéries.....	41
2.	Construction de plasmides.....	42
2-1	Construction de pIPR196.....	42
2-2	Construction de <i>pGFP-IMP2</i>	42
2-3	Construction de GST-TAF14.....	43
2-4	Construction d' <i>IMP2-MYC</i>	44
3.	La transformation.....	45
3-1	La transformation des levures.....	45
3-2	Transformation des bactéries.....	46
4.	L'extraction des protéines.....	46
4.	Les analyses β -galactosidase.....	47
6.	Marquage des sondes.....	47
7.	Extraction des ARN et Northern blot.....	48
8.	Expérience de retard sur gel.....	49
9.	Courbes de survie.....	50
10.	Extension par amorce.....	50
11.	Immunobuvardage.....	51
III-	Résultats.....	53
1.	La quantification de l'expression du gène rapporteur	
	IPE-LacZ chez les différentes souches sensibles à la BLM	54

2. Étude de la sensibilité des souches en condition de stress	56
2-1 Sensibilité à la BLM.....	56
2-2 La sensibilité au NaCl.....	57
2-3 La sensibilité au stress osmotique.....	58
2-4 La sensibilité au pH basique.....	59
3. Taf14 semble impliqué dans l'expression de <i>IMP2</i>	60
3-1 Taf 14 est important pour la transcription de l'ARNm de <i>IMP2</i>	60
3-2 Taf14 est important pour l'expression de la protéine de fusion Myc-Imp2...	61
4. La transformation de la souche <i>taf14Δ</i> par le plasmide <i>pGFP-IMP2</i> la rend plus résistante à la BLM	63
5. Restauration de tous les phénotypes liés au gène <i>IMP2</i> après la complémentation par un plasmide <i>pGST-TAF14</i> de la souche <i>taf14Δ</i>	65
5-1 La sensibilité à la BLM.....	65
5-2 La sensibilité au NaCl.....	67
5-3 La sensibilité au stress osmotique.....	68
5-4 La sensibilité au pH basique.....	69
5-5 La restauration des phénotypes liés l' <i>IMP2</i> est due à une expression de la protéine de fusion Gst-Taf14.....	70
6. Taf14 ne se fixe pas sur la région IPE et ne semble pas jouer de rôle dans la fixation de l'appareil de transcription de base	71
6-1 La purification de la protéine de fusion Gst-Taf14 par chromatographie sur colonne.....	71

6-2 La protéine de fusion Gst-Taf14 ne se fixe pas sur le promoteur d'IMP2.....	72
7. Le site d'initiation de transcription d'IMP2	74
IV- Discussion.....	76
1. Comment Taf14 active la transcription d'IMP2.....	78
1-1 Transcription directe d'IMP2 par Taf14.....	79
1-2 Transcription indirecte d'IMP2 par Taf14.....	81
2. De la levure à l'homme.....	83
3. Conclusion.....	85
Bibliographie	87

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1 :	Composition de divers complexes contenant Taf chez l'homme, la drosophile et la levure.....	16
Tableau I-2 :	La nouvelle nomenclature des Tafs chez l'homme, la drosophile et la levure.....	16
Tableau II :	Les différentes complexe SWI/SNF de la levure <i>S. cerevesiae</i>	21
Tableau III :	Un criblage des mutants sensible à la BLM chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
Tableau IV:	La quantification des niveaux d'expression de la β -galactosidase chez les différents mutants sensibles à la BLM.....	54

LISTES DES FIGURES

Figure 1 :	Les différentes étapes de la régulation de l'expression des gènes.....	2
Figure 2 :	TFIID peut avoir plusieurs fonctions différentes selon le type de TAF.....	13
Figure 3 :	TAF250 de TFIID: son activité catalytique et son rôle dans la régulation de transcription.....	18
Figure 4 :	Le niveau d'expression de la β -galactosidase du plasmide rapporteur après mutagenèse de la région promotrice de <i>IMP2</i>	27
Figure 5 :	Structure de Imp2.....	28
Figure 6 :	L'observation par microscope à fluorescence, après la transformation d'une souche sauvage (wt) par le plasmide <i>pGFP-IMP2</i>	32
Figure 7 :	Structure de la BLM et ses domaines fonctionnels.....	34
Figure 8 :	Mécanisme d'activation de la BLM.....	35
Figure 9 :	Essaie en spot mesurant la sensibilité à la BLM des souche sauvage (wt) et mutantes <i>imp2Δ</i> , <i>rnr4Δ</i> , <i>rnr1Δ</i> , <i>taf14Δ</i> et <i>spt10Δ</i>	56
Figure 10 :	Essaie en spot mesurant la sensibilité au NaCl des souche sauvage (wt) et mutantes <i>imp2Δ</i> , <i>rnr4Δ</i> , <i>rnr1Δ</i> , <i>taf14Δ</i> et <i>spt10Δ</i>	57

- Figure 11 :** Essaie en spot mesurant la sensibilité au CaCl_2 des souche sauvage (wt) et mutantes *imp2Δ*, *rnr4Δ*, *rnr1Δ*, *taf14Δ* et *spt10Δ*.....58
- Figure 12 :** Essaie en spot mesurant la sensibilité à pH basique des souche sauvage (wt) et les mutantes *imp2Δ*, *rnr4Δ*, *rnr1Δ*, *taf14Δ* et *spt10Δ*.....59
- Figure 13 :** Analyse de type Northern des souche sauvage (wt) et mutantes; *imp2Δ*, *rnr4Δ*, *spt10Δ*, *taf14Δ* avec la sonde JYM15.....60
- Figure 14 :** Immunobuvardage avec des anticorps anti-myc,63
- Figure 15 :** Courbe de survie montrant le pourcentage des cellules survivantes après un traitement par 25 $\mu\text{g/ml}$ de la BLM en fonction de temps.....64
- Figure 16 :** Essaie en spot mesurant la sensibilité à la BLM de la souche sauvage (wt) et les souches mutantes *imp2Δ*, *taf14Δ* et *taf14Δ+ pGst-Taf14*.66
- Figure 17 :** Essaie en spot mesurant la sensibilité au NaCl de la souche sauvage (wt) et les souches mutantes *imp2Δ*, *taf14Δ* et *taf14Δ+ pGst-Taf14*.....67
- Figure 18 :** Essaie en spot mesurant la sensibilité au CaCl_2 de la souche sauvage (wt) et les souches mutantes *imp2Δ*, *taf14Δ* et *taf14Δ+ pGst-Taf14*.....68
- Figure 19 :** Essaie en spot mesurant la sensibilité à de pH basique de la souche sauvage (wt) et les souches mutantes *imp2Δ* et *taf14Δ* et *taf14Δ+ pGst-Taf14*.....69
- Figure 20 :** Immunobuvardage avec des anticorps anti-GST.....70

- Figure 21 :** Un gel de polyacrylamide. Après la chromatographie sur colonne pour purifier la protéines de fusion Gst-Taf14.....72
- Figure 22:** Retardement sur gel, nous avons utilisé comme sonde la région promotrice IPE de *IMP2*.....73
- Figure 23:** Extension par des amorces du gène *IMP2*74
- Figure 24:** La carte de la région promotrice de *IMP2*.75
- Figure 25 :** Taf14 active les interactions protéine-protéine entre les différents complexes de transcription de *IMP2* déjà fixé sur IPE.....80
- Figure 26 :** Taf14 active la transcription de ITF (*IMP2* Transcription Factor) qui va se fixer sur l'appareil de transcription de base et activer à son tour l'expression d'*IMP2*..... 82
- Figure 27:** Schéma montrant les liens communs entre la levure et l'homme concernant les fonction d'*IMP2* et de son activateur Taf14.....84

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4-NQO	4-Nitroquinoline 1-oxyde
ABP	Actin binding Protein
ACT1	Gène d'actine
AP	Apurinique, Apyrimidique
APS	Ammonium persulfate
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARN pol I	ARN polymérase de type I
ARNpolII	ARN polymérase de type II
ARNpolIII	ARN polymérase de type III
ATP	Adénosine triphosphate
BLM	Bléomycine
Ca ²⁺	Calcium
CPI	Complexe de pré-initiation
GFP	Green Fluorescent protein
H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
IMP2	Independent of mitochondrial particle
Inr	Initiator
KDa	kilo Dalton
LB	Luria-bertani
-Leu	milieu minimal, sans leucine

I-Introduction

1. Régulation de la transcription des gènes chez les eucaryotes

Chez les procaryotes (exemple les bactéries), les systèmes de régulation de l'expression des gènes sont relativement simples car ils se limitent généralement au niveau de la transcription. Tout le génome bactérien est transcrit, suivi immédiatement par la traduction de l'ARN (Acide RiboNucléique) en protéines.

Les eucaryotes sont des organismes dits à vrai noyau et leur matériel génétique, qui existe sous forme condensée, la chromatine, est délimité par une enveloppe nucléaire. La chromatine est une structure associant l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) et des protéines basiques (exemple les histones). Pendant l'interphase, la condensation ne se fait pas au hasard car l'ADN doit rester accessible aux protéines qui régulent son expression et sa réplication.

Les systèmes de régulation d'expression génique des eucaryotes sont multi-étapes et souvent arborescents, depuis une structure particulière de la chromatine (niveau élevé de régulation) jusqu'à une régulation post-traductionnelle (dernière étape possible de régulation).

Le contrôle de l'expression génique peut s'effectuer à plusieurs niveaux (voir schéma 1)

- Initiation de la transcription et formation de l'ARNm. (1)
- Epissage et maturation de l'ARNm. (2)
- Stabilisation ou dégradation de l'ARNm. (3 et 4)
- Traduction de l'ARNm. (5)
- Modifications post-traductionnelle (ex : phosphorylation et/ou clivage) et localisation cellulaire. (6)

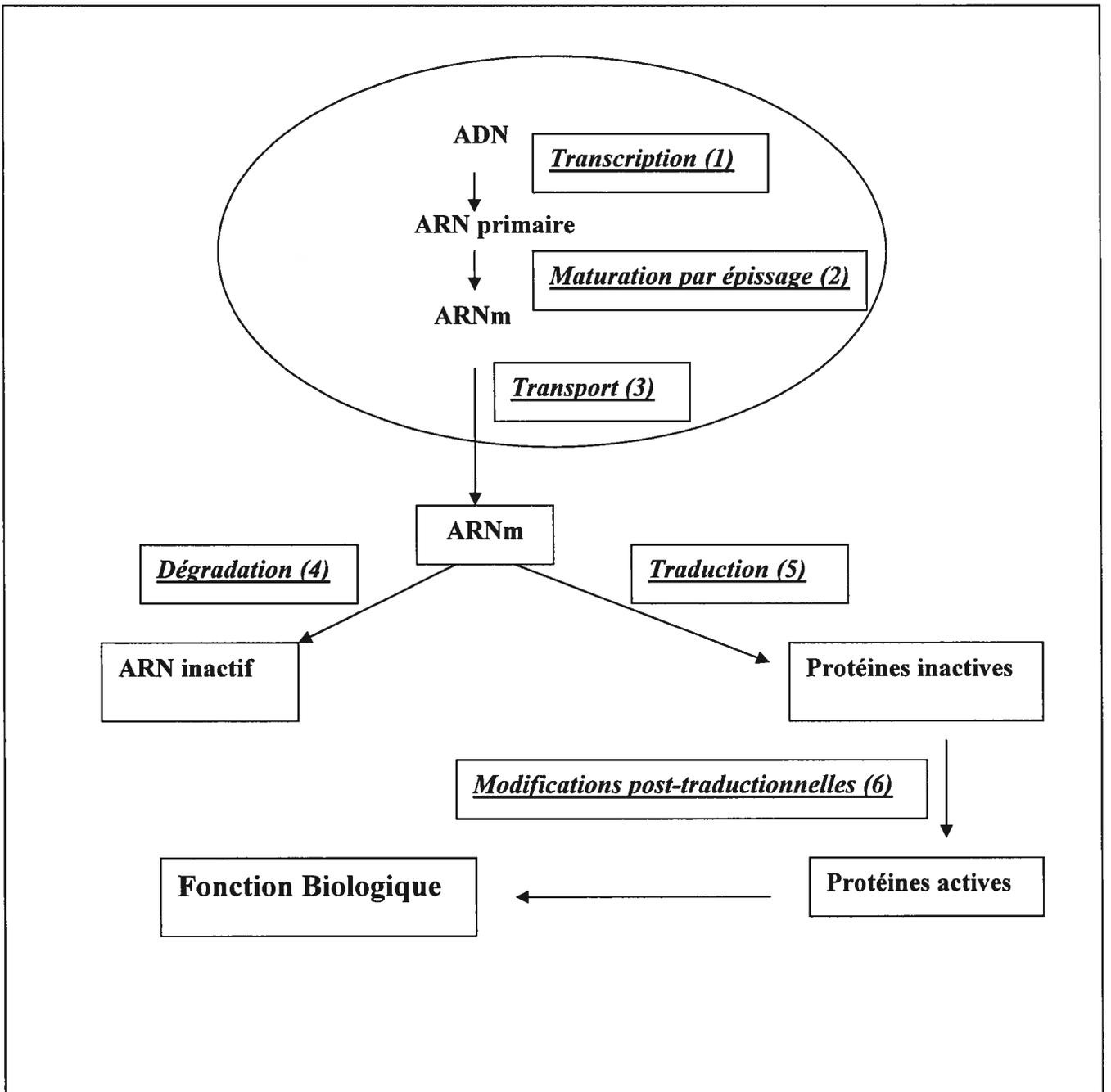


Figure 1 : Les différentes étapes de la régulation de l'expression des gènes.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est une cellule eucaryote, unicellulaire qui fait partie des champignons, dont le génome est totalement séquencé. Il est constitué de 12.1Mb comportant 5,885 gènes distribués sur 17 chromosomes (Bradbury, 1996).

La majeure partie du génome de la levure est conservée chez les mammifères y compris l'homme, ce qui fait de la levure un bon modèle pour étudier les mécanismes de régulation des gènes ainsi que leurs fonctions biologiques.

La régulation de la transcription est l'étape cruciale de l'expression génique et la plus étudiée aussi. Elle permet à la cellule de transcrire certains gènes selon le besoin et l'environnement cellulaire, donc c'est un phénomène sélectif. Mais il existe également des gènes qui sont transcrits de manière constitutive (gènes de ménages ou housekeeping gene), (Tugores *et al*, 1994).

Le type de promoteur, le site d'initiation et les facteurs de transcription sont les éléments les plus importants dans la régulation de la transcription.

1-1 Les promoteurs

Il existe en amont des gènes, des éléments régulateurs, les promoteurs, qui jouent un rôle important dans la transcription. Les promoteurs sont des séquences d'ADN relativement courtes reconnues par l'ARN polymérase et les facteurs de transcription. Ces séquences sont situées autour du site d'initiation de la transcription (indiqué par le symbole +1). Les séquences de ces promoteurs sont souvent très conservées chez les êtres vivants, car ce sont des éléments régulateurs très importants.

On peut distinguer deux classes d'éléments dans un promoteur : les éléments de base et les éléments activateurs communs et spécifiques.

1-1-1 Promoteur de base

C'est la région de l'ADN qui permet l'assemblage de l'appareil de transcription de base. Historiquement, une première région riche en adénine et thymine, appelée boîte TATA reconnu comme promoteur de base. Cette région située à environ 19-30 pb du site d'initiation de la transcription et fixe un facteur appelé TBP (TATA Binding Protein) qui appartient au complexe TFIID (Mathis et Chambon, 1981).

Cependant, certains promoteurs contiennent d'autres éléments permettant l'initiation de la transcription comme la boîte TATA : le BRE et le DPE

La séquence consensus du BRE (IIB Recognition Element) est 5'(G/C)(G/C)(G/A)CGCC3'. Elle est immédiatement suivie de la séquence consensus constituant la boîte TATA. Elle est reconnue par le facteur de transcription TFIIB par son motif hélice-boucle-hélice de liaison à l'ADN (Lagrange *et al*, 1998)

La séquence consensus du DPE (Downstream Promoter Element) est localisée entre la position +28 et +32: 5'(A/G)G(A/T)(C/T)(G/A/C)3'. Par rapport au site d'initiation de la transcription. Elle est reconnue par le facteur de transcription TFIID (Burke et Kadonaga, 1997).

Pour les gènes qui ne possèdent pas de boîte TATA (50 % des promoteurs chez la drosophile) (Burke *et al*, 1998), il existe une autre séquence conservée dite Inr (Initiateur) qui est généralement constituée d'une base azotée, l'adénine. Cette séquence englobe le site d'initiation de la transcription (Smale et Baltimore, 1989), (Smale *et al*, 1998) et semble pouvoir recruter TFIID via deux TAFs (Transcription Associated Factor), les TAF 250 et TAF150 (Chalkley et Verrijzer, 1999).

Le promoteur de base (appelé aussi promoteur minimal) peut contenir à la fois la boîte TATA et le site Inr, on parle alors de promoteur composé. Les deux boîtes coopèrent au recrutement de l'ARNpolII et augmentent l'activité du promoteur (Garraway *et al*, 1996).

1-1-2 Éléments activateurs communs

Des études effectuées sur des gènes rapporteurs ont révélé l'existence d'au moins trois éléments activateurs communs. Plusieurs types de promoteurs associés à la boîte TATA sont connus et comportent par exemple, une boîte CAAT reconnue par plusieurs type de protéines comme la famille CTF, ou encore une boîte GC reconnue par la protéine Sp1 (Loregger *et al*, 2003), (Vasicek *et al*, 2003).

1-1-3 Éléments activateurs spécifiques

Ce sont des éléments qui contrôlent la transcription suite à un signal bien défini, par exemple le stress. Ces éléments sont reconnus par des facteurs de transcription spécifiques qui activent la transcription d'un gène donné afin de répondre au signal. C'est le cas de l'élément TGACTCA qui est reconnu par le facteur AP1 lors d'un stress oxydant (Jamieson, 1998).

1-2 Les ARN polymérases

Les ARN polymérases sont des complexes de plusieurs protéines et leur rôle est la transcription de l'ARN à partir d'une matrice d'ADN.

A la différence des procaryotes, il existe au moins trois types d'ARN polymérases chez les eucaryotes, chacune possédant un rôle spécifique. On distingue trois types d'ARN polymérases selon leur fonction: ARN pol I, II et III.

1-2-1 L'ARN polymérase I

L'ARN polymérase de type I synthétise les ARN ribosomiaux 18S et 28S qui constituent les ARN les plus représentés dans la cellule eucaryote. (Hannan *et al*, 1998).

L'ARN pol I est localisée au niveau du nucléole et se lie spécifiquement au promoteur de l'ADN ribosomal. Ce dernier est constitué de deux régions critiques pour la transcription, une région basale, ou « core-promoter », et la région UCE (Up control element). Lors de la transcription, il y a fixation d'un facteur de transcription UBF1 sur la région basale et fixation du facteur SLI sur la région UCE. Lorsque ces deux facteurs sont fixés, l'ARN pol I est capable d'interagir avec ces deux éléments et de se lier à son tour sur le promoteur, déclenchant ainsi la transcription des ARN ribosomiaux à partir d'un transcrit unique (Nygard *et al*, 1994).

1-2-2 L'ARN polymérase III

L'ARN polymérase III est impliquée dans la transcription de plusieurs ARN: les ARN de transferts, l'ARN ribosomal 5S, et les ARNs dits snRNA (Gabrielsen *et al*, 1991).

Selon les facteurs de transcription, on distingue deux types de promoteurs reconnus par l'ARNpolIII (White *et al*, 1992) :

- Le promoteur de l'ARN de transfert et de l'ARN ribosomal 5S sont reconnus par les facteurs de transcription TFIIIA, TFIIIB et TFIIIC.
- Le promoteur des snRNA est constitué de trois éléments: la boîte TATA, l'élément de séquence proximal et l'élément oct. Ces éléments peuvent être reconnus par l'ARN polymérase de type III (Gabrielsen *et al*, 1991).

1-2-3 L'ARN polymérase II

C'est l'ARN polymérase impliquée dans la transcription des ARN messagers (ARNm) qui seront traduits en protéines. C'est un complexe protéique important constitué de plusieurs unités régulatrices (12 sous-unités) (Lee *et al*, 2000).

Le mégacomplexe ARN pol II holoenzyme inclue en plus l'ensemble de l'ARN pol II le complexe SRBs (suppressors of RNA polymerase B mutations) (Kim *et al*, 1994), le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, le complexe de réparation de l'ADN (Ossipow *et al*, 1995), histone acetyltransferase GCN5 et les facteurs de transcription TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH, (Wu et Chiang, 1998). Cet mégacomplexe est incapable de se lier de manière stable sur son promoteur et il a toujours besoin d'un complexe de pré-initiation de transcription. Ce dernier va maintenir la stabilité de l'ARN pol II holoenzyme sur l'ADN afin d'activer l'initiation de la transcription proprement dite.

1-3 L'appareil de transcription de base

Comme il a été avancé, l'ARN pol II a besoin du complexe de pré-initiation qui va lui permettre de se fixer de manière stable et d'activer la transcription de l'ADN. Par conséquent la mise en place du complexe de pré-initiation de la transcription (CPI) est une étape essentielle dans l'activation des gènes.

L'assemblage du CPI débute par la fixation du complexe TFIID sur la boîte TATA, par sa sous-unité TBP (TATA Binding Protein) et sa stabilisation par TFIIA. La fixation de TFIID sur l'ADN va permettre le recrutement de

TFIIB en amont de TFIID ce qui va orienter le sens de la transcription par le CPI. Le facteur de transcription TFIIB recrute l'ARN pol II, le facteur TFIIF et le facteur TFIIE. Ce dernier va recruter le TFIIH qui possède deux activités hélicases permet à la double hélice d'ADN de s'ouvrir en deux brins séparés (Mary and Cheng, 2006).

En plus de ses activités hélicase, TFIIH a une activité protéine-kinase. Ce facteur en présence d'ATP permet la phosphorylation de l'ARN pol II au niveau des résidus sérines et thréonines de la plus grosse sous-unité de l'enzyme (partie C-terminale). Cette phosphorylation libère la polymérase du CPI et permet la progression de l'ARN pol II sur la matrice d'ADN (Orphanides *et al*, 1996).

1-4 Les facteurs de transcription

Les facteurs généraux de la transcription (GTF) sont des complexes protéiques dont une des fonctions est d'assurer la stabilité du complexe d'initiation de la transcription.

Le développement du système de transcription *in vitro* (run off) a permis la mise en évidence des facteurs généraux de transcription de la famille TFII (TFIIA, TFIIB, TFIID, THIE, TFIIF, TFIIH et TFIIS), (Mary and Cheng, 2006). Ils sont aussi bien indispensables pour la transcription de base que celle activée. Par interaction protéine-protéine, certains de ces facteurs, permettent le recrutement de l'ARN pol II sur le promoteur via une fixation spécifique à l'ADN (Hoffman *et al*, 1990), (Lee et Youngl, 2000).

Le facteur TFIID a un rôle fondamental dans l'initiation de la transcription. Le TFIID est composé de plusieurs unités protéiques dont la TBP et les sous unités Tafs (TBP associated factor).

La TBP joue un rôle essentiel dans l'initiation de la transcription et elle interagit avec la séquence de la boîte TATA du promoteur. La structure de la TBP est conservée chez tous les eucaryotes et ainsi on la retrouve dans de nombreux complexes régulant la transcription.

Cette protéine présente une structure unique en forme de selle de cheval (Patikoglou et Burley, 1997) qui lui permet d'induire de fortes torsions d'ADN afin de faciliter le contact entre les différents éléments du complexe d'initiation de la transcription.

2. La famille des Tafs (TBP-Associated Factors)

TFIID est un complexe clé dans la machinerie de la transcription. C'est un complexe protéique constitué de TBP et de 10 sous unité appelés Tafs (Burley *et al*, 1996).

Les Tafs ne sont pas toujours associés à la TBP, car elles peuvent activer et réguler la transcription de gènes dépourvus de boîte TATA.

Les Tafs peuvent aussi faire partie d'autres complexes protéiques que TFIID, pour exercer d'autres fonctions biologiques que la transcription des gènes. Dans le système nerveux de la Drosophile par exemple, on trouve le complexe TRF (TBP related factor) associé au Tafs et ce complexe TRF-Taf semble être l'équivalent fonctionnelle de TFIID pour certains promoteurs spécifiques (Hansen *et al*, 1997).

Un autre complexe contient les sous-unités Tafs mais dépourvu de la TBP; il s'agit du complexe TFTC (TBP-free TAF containig complexe). La fonction de TFTC est similaire à celle de TFIID pour les promoteurs ne possédant pas de boîte TATA (Wieczorek *et al*, 1998).

Des études biochimiques ont montré aussi que les Tafs de TFIID font aussi partie des composés du complexe d'acétylase d'histone; cette acétylation permet le remodelage de la chromatine aussi bien chez la levure (complexe SAGA) que chez l'homme (complexe PCAF) (Grant *et al*, 1998), (Ogryzko *et al*, 1998).

À première vue, la présence des Tafs à la fois dans le complexe TFIID et dans les complexes d'acétylation des histones donne une idée sur la relation éventuelle entre la machinerie de la transcription et le remodelage de la chromatine (Struhl *et al*, 1998).

2-1 Les propriétés biochimique des Tafs

Les Tafs sont des protéines très conservées dans l'évolution, (voir Tableau I), ce qui signifié leur importance dans le bon fonctionnement de la cellule.

Des études *in vitro* ont montré que les sous-unités Tafs jouent un rôle critique dans la transcription. Certains Tafs interagissent directement avec l'initiateur Inr et avec la partie antérieure du promoteur « Downstream promotor elements » (Burley *et al*, 1996). Ceci est spécifiquement démontré pour la transcription des gènes dépourvus de boîte TATA (Martinez *et al*, 1994). Ceci nous amène donc à penser que les Tafs agissent directement avec l'ADN.

Mais généralement les Tafs sont des coactivateurs qui favorisent l'interaction entre les facteurs de transcription de base et le complexe de préinitiation (Verrijzer *et al*, 1996).

Chez les eucaryotes, certaines sous-unités Tafs sont essentielles pour la régulation de la transcription des gènes dépourvus de boîte TATA (Martinez *et al*, 1994), et donc pour la viabilité de la cellule (Sauer *et al*, 1997), (Walker *et al*, 1996).

Chez la levure, l'absence des Tafs (TAFII90) conduit à un arrêt de croissance à des stades spécifiques du cycle cellulaire, ce que signifie l'importance des Tafs dans la transcription des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Apone *et al*, 1996).

Mais comment TAFs participent-ils à la transcription des gènes?

Les Tafs jouent probablement un rôle dans la réponse de la machinerie de l'ARN pol II à des activateurs, et dans certaines situations les Tafs sont impliqués dans le recrutement des activateurs dépendant de TFIID et de l'ARN pol II (Verrijzer *et al*, 1995).

Malgré le fait que cette hypothèse d'interaction entre les Tafs et ces activateurs soit probable, néanmoins, elle n'est pas sans lacune.

Ainsi, la transcription peut s'effectuer sans Tafs *in vitro* chez la levure et chez les mammifères (Hengartner *et al*, 1995).

Donc, l'hypothèse que les Tafs soient la cible directe des activateurs de transcription n'est pas encore claire. Il semble que les Tafs jouent un rôle dans la progression d'activation de transcription par un comportement biochimique distinct de TFIID et TBP (Fig2), par exemple, la stabilisation des activateurs de transcription au sein du complexe de préinitiation.

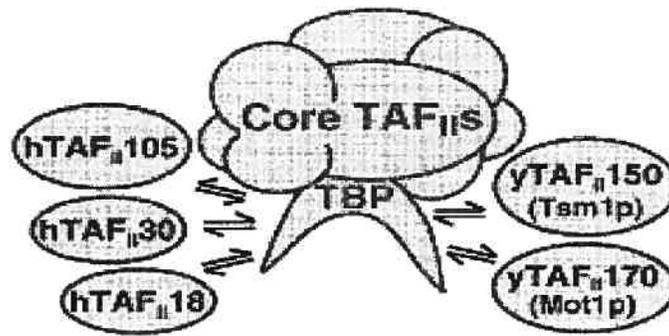


Figure 2: TFIID peut avoir plusieurs fonctions différentes selon le type de TAF.
(Jaehning *et al*, 1997)

2-2 Fonction des TAFs dans la transcription

TFIID, présent chez tous les eucaryotes, est un facteur de transcription essentiel pour la transcription de base, et se compose de la TBP et des sous-unités Tafs. Des études de structure et de fonction des Tafs ont montré qu'en plus de leur rôle de protéines d'échafaudages au sein du complexe TFIID, les Tafs peuvent aussi avoir un rôle dans la régulation de transcription (Shen *et al*, 1997).

Les travaux de (Brou *et al*, 1993) ont permis d'identifier plusieurs complexes TFIID capable de répondre à différentes classes d'activateurs (voir Tableau I). Donc, on distingue plusieurs complexes TFIID selon les Tafs qui leur sont associés, ce qui traduit une transcription gène-spécifique. A titre d'exemple l'unité Taf4b a été associée

spécifiquement dans le complexe de TFIID dans les lymphocytes B (Dikstein *et al*, 1996).

Comme il a été avancé, chez les mammifères et la levure la transcription *in vitro* peut s'effectuer sans Tafs (Hengartner *et al*, 1995), (Oelgeschlager *et al*, 1998).

Chez la levure, les protéines Tafs sont essentielles pour le cycle cellulaire, mais la déficience d'une variété individuelle des Tafs n'affecte pas de manière significative l'activation de la transcription d'une vaste variété de gènes (Moqtaderi *et al*, 1996).

Ces résultats montrent que les Tafs ne sont pas **généralement** requis pour l'activation de la transcription. Alors que certaines Tafs sont impliquées dans l'activation de gènes spécifiques (Lee et Yong, 1998), des études par mutagenèse de la sous-unité Taf 5 menées chez la levure ont montré l'importance de cette dernière dans le bon déroulement du cycle cellulaire, sans que cela affecte la transcription d'autres gènes. Ceci suggère que les Tafs agissent de façon sélective dans la transcription des gènes.

2-3 Rôle des TAFs dans la modification de la chromatine

3-1 La modification de la chromatine

La structure de la chromatine peut avoir un effet considérable sur l'expression des gènes (Rea *et al*, 2000). La condensation de l'ADN en nucléosome est constituée d'un octamère d'histone et d'environ 140 pb d'ADN enroulées autour. Cette condensation rend l'ADN moins accessible à l'ARN pol II et aux autres facteurs de transcription, on parle alors d'effet répressif du nucléosome.

Il y a des complexes protéiques qui peuvent modifier la structure de la chromatine pour rendre l'ADN accessible aux facteurs de transcription. Ces complexes agissent par deux mécanismes différents : modification covalente de la chromatine et modification non covalente.

- Modification covalente de la chromatine

C'est une modification directe de l'interaction entre les histones et l'ADN. Il s'agit de l'activité acétyltransférase des histones (HAT). Cette activité est assurée par le complexe SAGA chez la levure et le complexe PCAF chez l'homme, ce complexe ajoute des groupements acétylés sur les résidus lysines situés aux extrémités N-terminales des histones. Cette acétylation rend l'ADN accessible aux différents facteurs de transcription (Reas et al. 2000).

- Modification non covalente de la chromatine

Il s'agit du remodelage conformationnel de la chromatine, aboutissant au mouvement du nucléosome. Chez la levure, cette mobilité est assurée par un grand complexe protéique, le plus connu est le complexe SWI/SNF, mais il existe plusieurs autres complexes de remodelage de chromatine comme RSC, BRG1, ISWI, CHRAC (Neely et Workman, 2002). Cette mobilité consomme de l'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) pour mobiliser le nucléosome et rendre l'ADN accessible aux facteurs de transcription (Lorch *et al.* 1998).

TAF _{II} -Containing Complexes						
	Containing TBP			Lacking TBP		
	yTFIID	dTFIID	hTFIID	ySAGA	hTFTC	hPCAF compl.
HAT	145 (130)	230	250	—	—	—
	TSM1	150	150	—	N.D.	N.D.
Q rich	—	110	135	—	135	—
WD 40 repeats	90	80	100	90	100	—
						(PAF65 β)
Histone H4 like	60	62	80 (70)	60	80	—
						(PAF65 α)
	67	55	55	—	55	N.D.
Histone H3 like	17 (20)	42	31 (32)	17 (20)	31 (32)	31 (32)
	25	N.D.	30	25	30	30
Histone like	40	30 β	28	—	—	N.D.
Histone H2B like	68 (61)	30 α	20 (15)	68 (61)	20 (15)	20 (15)
Histone H4 like	19 (FUN81)	N.D.	18	—	—	N.D.
	yTBP	dTBP	hTBP	—	—	—
HAT	—	—	—	yGcn5	+	PCAF

Tableau I-1 : Les complexes contenant la sous unité Taf, chez l'homme, la drosophile et la levure (Brendan *et al.*, 1999).

New name	<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
TAF1	TAF _{II} 250	TAF _{II} 230	Taf145/130	TAF _{II} 111
TAF2	TAF _{II} 150	TAF _{II} 150	Taf150	T38673*
TAF3 [†]	TAF _{II} 140	TAF _{II} 155	Taf47	
TAF4 [†]	TAF _{II} 130/135	TAF _{II} 110	Taf48	T50183*
TAF4b [†]	TAF _{II} 105			
TAF5	TAF _{II} 100	TAF _{II} 80	Taf90	TAF _{II} 72
TAF5b				TAF _{II} 73
TAF5L	PAF65 α	Cannonball		
TAF6 [†]	TAF _{II} 80	TAF _{II} 60	Taf60	CAA20756*
TAF6L	PAF65 α	AAF52013*		
TAF7	TAF _{II} 55	AAF54162*	Taf67	TAF _{II} 62/PTR6
TAF7L	TAF2Q			
TAF8 [†]	BAB71460*	Prodos	Taf65	T40895*
TAF9 [†]	TAF _{II} 32/31	TAF _{II} 40	Taf17	S62536*
TAF9L	TAF _{II} 31L			
TAF10 [†]	TAF _{II} 30	TAF _{II} 24	Taf25	T39928*
TAF10b		TAF _{II} 16		
TAF11 [†]	TAF _{II} 28	TAF _{II} 30 α	Taf40	CAA93543*
TAF11L				
TAF12 [†]	TAF _{II} 20/15	TAF _{II} 30 α	Taf61/68	T37702*
TAF13 [†]	TAF _{II} 18	AAF53875*	Taf19	CAA19300*
TAF14			Taf30/ANC1*	
TAF15	TAF _{II} 68*			
BTAF1	TAF _{II} 170	Hel89B	Mot1	T40642*

Tableau I-2 : La nouvelle nomenclature des Tafs chez l'homme, la drosophile et la levure ((Mary and Cheng, 2006)

3-2 Activité catalytique des Tafs

TFIID n'est pas seulement un complexe protéique qui interagit avec les promoteurs, mais c'est aussi une enzyme (par le biais de sa sous-unité Taf 1) qui possède deux activités distinctes : une activité acétyltransférase des histones et une activité kinase.

- Activité acétyltransférase des histones (HAT)

C'est une étape importante pour la transformation de la chromatine inactive en une chromatine active accessible aux facteurs de transcriptions.

Plusieurs facteurs de transcription ont montré une activité HAT comme celle de TAF 1 chez les mammifères (Mizzen *et al*, 1996). Cette activité d'acétylation est conservée aussi bien chez la levure (Taf 1) (Gangloff *et al*, 2001) que chez la drosophile (Taf 1). Cette activité HAT des TAFs est similaire à celle de Gcn5 du complexe SAGA chez la levure et le complexe PCAF chez l'homme.

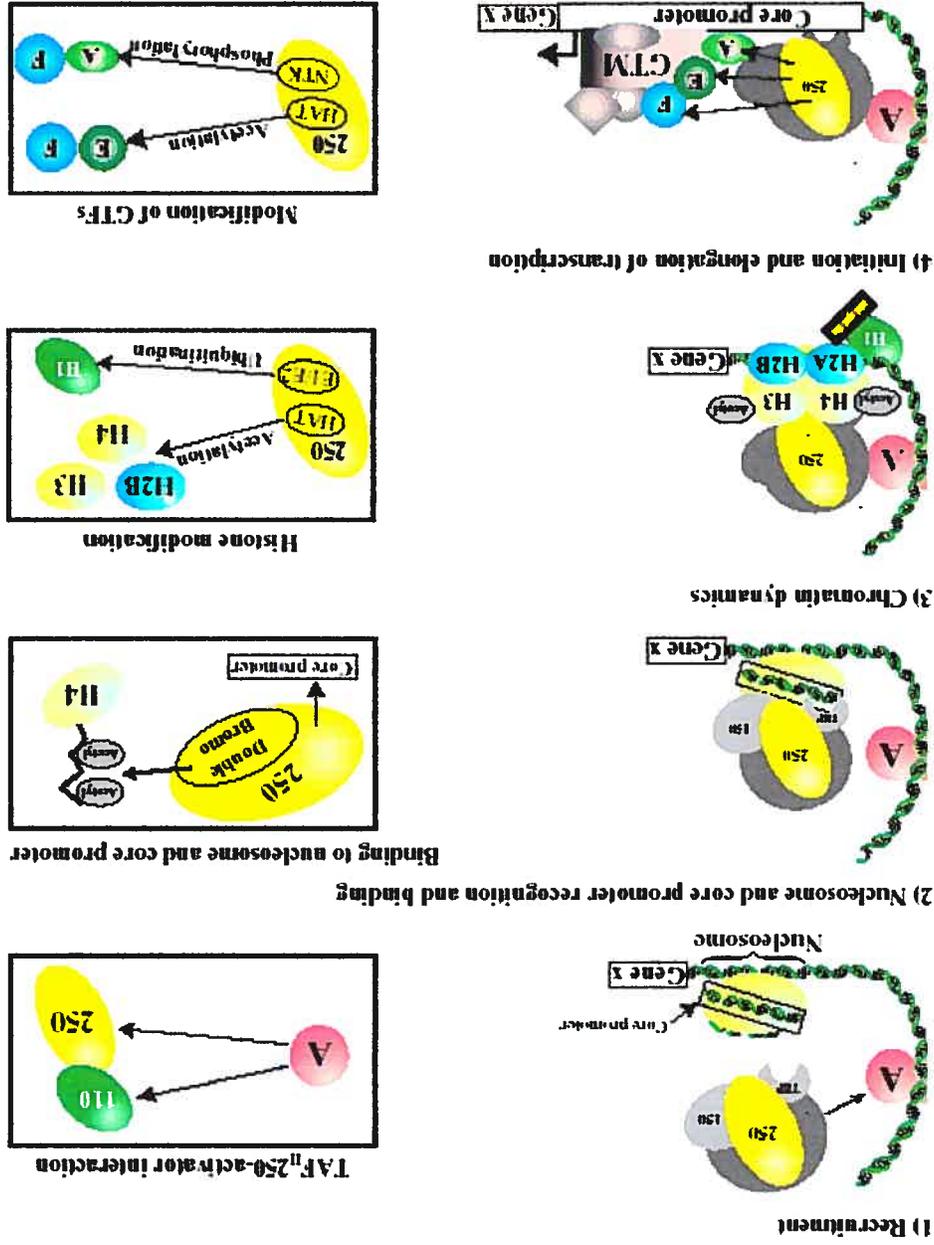
Il semble que l'activité HAT des Tafs facilite la formation du CPI au niveau du promoteur masqué ou inhibé par le nucléosome.

Chez la levure, bien que le complexe SAGA est constitué de certaines sous-unités Tafs comme Taf 6 et Taf 12, l'activité HAT est assurée par la sous-unités Gcn 5, (Grant *et al*, 1998). Ainsi toujours chez la levure, c'est la sous-unités Tafs 1 du complexe TFIID qui sont responsables de l'activité HAT. Ce qui rend la compréhension de la fonction physiologique des Tafs plus complexe.

- Activité de phosphorylation

En plus de l'activité HAT, la sous-unité Taf 250 de TFIID possède une activité d'autophosphorylation (Dikstein *et al*, 1996). Comme elle possède aussi une activité protéine kinase d'autres facteurs de transcription comme TFIIF, TFIIA et TFIIIE (voir figure3) (Dikstein *et al*, 1996).

Figure 3 : TAF_{II} de TFIIID son activité catalytique et son rôle dans la régulation de transcription (Sauer *et al*, 2001)



transcription (Sauer *et al*, 2001)

3-Taf 14

Taf14 est une protéine nucléaire de 27 KDa connue aussi sous d'autres noms, Anc1, Tfg3, Taf 30 ou Swp 29 (www.yeastgenome.org/).

C'est une protéine très conservée chez la levure et l'homme, d'où son importance. La fonction exacte de Taf 14 n'est pas encore claire puisque que chez la levure les mutants *taf14Δ* sont viables mais sont sensibles aux stress osmotique et thermique (Vinh *et al*, 1993). Taf14 est le seul gène non essentiel de la famille des TAFs.

3-1 TAF14 est important dans la morphogenèse cellulaire

- *Le rôle des filaments d'actine*

Pendant le cycle cellulaire, la levure change de morphologie pour s'adapter à ce processus vital. Il y a formation de la nouvelle membrane plasmique et synthèse du matériel nécessaire à la construction de la paroi cellulaire, etc.

Ce changement morphologique implique une organisation spatiale précise de la cellule (Drubin, 1991). Ce sont les filaments d'actine qui jouent un rôle central dans ce changement morphologique.

Les filaments d'actine sont arrangés de façon à permettre une polarité de la cellule. Cette polarité est importante pour la croissance et le bourgeonnement de la levure (Adams et Pringle, 1984). Les filaments d'actine permettent une orientation du bourgeonnement chez la levure lors de la reproduction végétative (Rout *et al*, 1990).

L'actine 1 (Act1) et les protéines qui lui sont associées (ABP actine binding protein) constituent l'élément principal induisant ce changement morphologique et l'orientation de la levure (Barnes *et al*, 1990).

- Taf14 et le fonctionnement d'actine

Chez la levure, les travaux sur les filaments d'actine (Welch et Drubin, 1994) ont montré par des expériences de criblage génétique qu'une mutation de Taf14 provoque des défauts dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Aussi, une mutation de Taf14 donne un phénotype thermosensible et osmosensible (Vinh *et al*, 1993).

Ces phénotypes sont similaires à ceux causés par une mutation de Act1 (Novick *et al*, 1985). Ce qui suggère que Taf14 est important pour un bon fonctionnement du cytosquelette d'actine, ainsi que pour l'orientation du bourgeonnement de la levure, puisque Taf14 est impliqué dans la localisation de Spa2 une protéine de polarité cellulaire (Welch et Drubin, 1994).

Taf14 n'est pas une protéine associée à l'actine (Welch et Drubin, 1994). Cependant elle est importante pour une bonne structure des filaments d'actine dans la cellule, probablement Taf14 est impliquée dans l'activation de la transcription de l'actin ou des protéines associées au l'actine (ABP) et/ou la maintenance de la morphologie du chromosome.

3-2 Taf14 fait partie du complexe SWI/SNF

La chromatine joue un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes durant le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire (Workman *et al*, 1998). Plusieurs études biochimiques ont montré l'importance de la chromatine dans la répression de la transcription (Grunstein *et al*, 1990).

Les modifications de structure de la chromatine par des interactions non covalentes sont assurées par des complexes protéiques ATP-dépendants qui utilisent l'énergie pour faire glisser le nucléosome sur l'ADN. Cette mobilité du nucléosome va rendre l'ADN plus accessible à la machinerie de transcription, comme elle peut diminuer l'accessibilité à la machinerie de transcription (Lorch *et al*, 1998).

Complex	Organism	Activities of complex	Subunits	Features	Size
SWI/SNF Family					
Swi/Snf	<i>S. cerevisiae</i>	Chromatin remodeling activity	Swi1 Swi2/Snf2 Swi3 Snf5/Swi10 Snf6 Snf11 Snf12 Swp82 Swp59 Swp61 Swp29	ATPase, not essential Similar to RSC8 Swp73, similar to RSC6 Arp9, actin-related protein Arp7, actin-related protein Subunit of TFIIIF and TFIIID	148 kDa 194 kDa 93 kDa 103 kDa 37 kDa 19 kDa 73 kDa ~82 kDa 53 kDa 54 kDa 27 kDa

Tableau II : Les différents complexes SWI/SNF de la levure *S. cerevisiae*. (Lee et Young, 2000)

Chez la levure, le complexe SWI/SNF est connu pour son rôle dans le remodelage de la chromatine. Des études biochimiques ont identifié 11 composés de ce complexe SWI/SNF : Swi1/Adr6, Swi 2/Snf 2, Snf3, Snf 5, Snf6 (Peterson *et al*, 1994), Snf11 (Treich *et al*, 1995), Swp73/Snf12 (Cairns *et al*, 1996) et Taf 14 appelé aussi Swp29 (Cairns *et al*, 1996) (voir Tableau II).

Bien que Taf14 interagisse fortement avec Snf5 dans le complexe SWI/SNF, son rôle reste encore mal défini, car une délétion de Taf14 n'affecte pas de manière significative le phénotype associé au complexe SWI/SNF (Cairns *et al*, 1996).

3-3 Taf14 et le complexe TFIIF

Taf14 est une sous-unité qui fait parti de TFIID mais aussi de TFIIF (Henry *et al*, 1994). En effet Taf14 est l'une des trois sous-unités de TFIIF (Tfg1 et Tfg2), permettant plus de stabilité entre les deux autres unités de TFIIF.

Toujours chez la levure, Taf 14 est une sous-unité constituant des trois complexes distincts : TFIID, TFIIF et SWI/SNF. Tous ces complexes sont impliqués dans l'activation de la transcription, donc il est possible que Taf14 joue un rôle de pont au sein de ces complexes.

Or, la sous-unité Taf14 ne semble pas jouer un rôle crucial dans la structure de ces complexes, puisque la mutation de Taf 14 n'affecte ni la structure ni la fonction de ces complexes (Henry *et al*, 1994). Probablement la sous-unité Taf14 rend les trois complexes plus stables, comme elle peut contribuer à l'association de ARN pol II à ces trois complexes.

Une autre possibilité de la fonction de Taf14 lors de la transcription est qu'elle peut masquer les sites d'interactions de ces trois complexes (Henry *et al*, 1994).

3-4 Taf14: un homologue de Af 9/Enl chez l'homme

Taf 14 présente une homologie de séquence avec deux protéines humaines ENL (Tkachuk *et al*, 1992) et AF 9 (Nakamura *et al*, 1993), et cette similitude concerne les régions N-terminales et C-terminales.

Bien que les fonctions de Enl et Af 9 ne soient pas bien déterminées, il semble que ces deux protéines sont des activateurs de transcription puisqu'elles activent un gène rapporteur *in vivo* (Lavau *et al*, 1997).

La translocation chromosomique réciproque des gènes Enl et Af 9 est associée à une leucémie aiguë chez l'homme (Nakamura *et al*, 1993). Une altération dans l'organisation du cytosquelette d'actine est retrouvée souvent dans les cellules tumorales (Leung *et al*, 1992). Donc on peut penser que Enl et Af 9 participent au bon fonctionnement des filaments d'actine. On peut donc conclure qu'une conservation de structure et de fonction de Taf14 a lieu au cours de l'évolution.

4- Les facteurs de transcription YAP

De nombreuses séquences permettant le recrutement de facteurs de transcription spécifiques ont été mis en évidence en amont des promoteurs. Ces facteurs spécifiques modulent et arrangent le recrutement des facteurs généraux de la transcription. Ces facteurs sont soit des activateurs soit des répresseurs de transcription.

4-1 Le stress oxydant

Le stress cellulaire est une situation de contrainte pour la cellule. Il y a plusieurs types de stress cellulaire: stress oxydant, thermique, osmotique, etc.

Le plus fréquent des stress étudiés est celui de type oxydant qui génère des dérivés oxygénés dits Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO).

Les ERO peuvent être d'origine endogène et/ou exogène. Les ERO endogènes sont tels que les produits de la respiration cellulaire, du métabolisme des hormones, des cytokines et de la phagocytose. Les ERO d'origine exogène sont générés par des agents chimiques ou physiques tels que les xénobiotiques oxydants (médicaments, polluants) et l'irradiation.

Les ERO peuvent avoir des effets toxiques sur les macromolécules biologiques comme l'ADN, l'ARN et les protéines (Radicella *et al*, 1997), (Halliwell et Gutteridge, 1984), et ceci peut entraîner une génotoxicité et l'apparition de mutations à l'intérieur des gènes.

Mais la cellule au cours de l'évolution a développé un système de défense anti-stress et une adaptation aux conditions de stress cellulaire.

4-2 La réponse cellulaire au stress

On distingue trois types d'adaptation et de défense cellulaire en réponse au stress (Jamieson, 1998) :

- La libération de petites molécules anti-oxydantes comme la vitamine C et la vitamine E.
- L'induction ou la répression d'expression de certains gènes. C'est le cas: d'une activation des gènes de réparation d'ADN (Farr et Kogoma, 1991), et la répression des gènes pro-oxydants.
- L'apoptose, processus déclenché par la cellule lorsqu'il y a trop de dommages cellulaires.

4-3 YAP1 est un facteur de transcription impliqué dans la régulation du stress oxydant

Chez la levure, YAP1 est un facteur de transcription de la famille b-Zip (leucine zipper), impliqué dans la réponse cellulaire au stress oxydant. Les mutants *YAP1* Δ sont très sensibles au stress causé par certains agents oxydants comme H_2O_2 (Schnell et Entian, 1991), (Kuge et Jones, 1994).

Les homologues de YAP1 chez les mammifères sont (AP-1) exemple: c-Fos et c-Jun (Moye-Rowley *et al*, 1989), (Karin *et al*, 1997).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* la famille de YAP est constituée de huit membres: YAP1, YAP2, YAP3, YAP4..... et YAP8. Ce sont des facteurs de transcription possédant un domaine b-ZIP permettant l'interaction avec l'ADN (Landschulz *et al*, 1988). Ces protéines possèdent une région C-terminale très conservée

qui comporte le signal d'exportation nucléaire (NES) (Kuge *et al*, 1998) et (Yan *et al*, 1998).

Dans les conditions normales, YAP1 est localisée dans le cytoplasme, mais après exposition de la cellule à différents agents oxydants comme le diamide, le diéthylmaléate ou l'H₂O₂, la protéine YAP1 est rapidement transloquée dans le noyau (Kuge *et al*, 1997). Une fois dans le noyau, YAP1 va activer la transcription de gènes anti-oxydants tel que TRX2, YCF1, GSH1 et GLRI qui codent respectivement pour les protéines thiorédoxine (Kuge et Jones, 1994), γ -glutamylcystéine synthétase (Wu et Moye-Rowley, 1994) et glutathione réductase (Grant *et al*, 1996).

Dans les conditions normales, l'exportation de YAP1 hors du noyau est assurée par son transporteur spécifique Xpo1p ; ce dernier se fixe au niveau de la séquence NES de YAP1. Dans les conditions de stress, il y a formation d'un pont disulfure entre les deux résidus cystéine de NES ce qui empêche la fixation de Xpo1p sur YAP1 et par conséquent la translocation de ce dernier hors du noyau (Kudo *et al* 1999), (Zhang *et al* 2000).

4-4 Le promoteur des YAP1

Des études biochimiques et des analyses cristallographiques chez les mammifères ont montré que la région de liaison des facteurs de transcription AP-1 sur l'ADN est constituée de 7pb 5'-TGACTCA-3' appelé aussi TRE (TPA Response Element) (Ellenberger *et al*, 1992) .

Le facteur de transcription AP-1 se lie sur la séquence TRE soit sous forme d'un hétérodimère (fos-jun) soit sous forme d'un homodimère (jun-jun). (Rauscher *et al*, 1988).

Mais chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* les YAPs interagissent avec une séquence promotrice 5'-TGACTAA-3'; cette dernière ne diffère que par une seule paire de base de la région promotrice d'AP-1 (voir séquence ci-dessus) (Hirata *et al*, 1994).

5-IMP2 (*Independent of Mitochondial Particle*)

Le gène *IMP2* est identifié la première fois par l'équipe du D^r Donnini, et code pour un activateur de transcription des gènes impliqués dans le métabolisme de certains sucres (Donnini *et al*, 1992).

5-1 Le promoteur d'IMP2

Imp2 est un activateur de transcription qui contrôle l'expression de plusieurs gènes, surtout ceux impliqués dans la régulation du stress chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Des expériences de délétions du promoteur *IMP2* effectuées dans notre laboratoire (données non publiées) ont montré l'existence d'une région indispensable pour l'activation de la transcription d'*IMP2* (fig4)

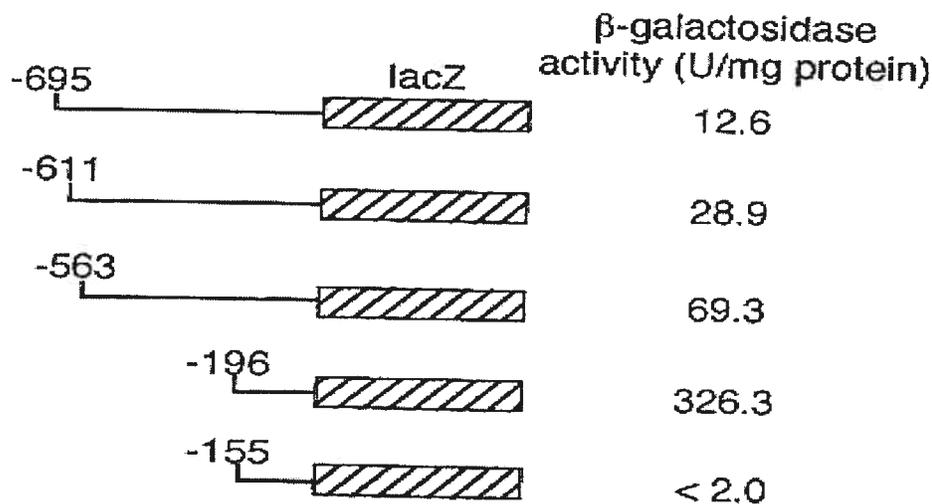


Figure4 : Le niveau d'expression de β -galactosidase du plasmide rapporteur après mutagenèse de la région promotrice d'*IMP2* (Ramotar et al, non publié)

Cette région promotrice, appelée **IPE** (*IMP2 Promotor Element*), contient la séquence consensus (**TGACTAA**) également reconnue aussi par les facteurs de transcription YAP1 (Hirata *et al*, 1994).

Le gène *IMP2* est exprimé de manière constitutive. Cependant le facteur de transcription interagissant avec la région promotrice d'*IMP2* (IPE) n'est pas encore identifié. D'autres expériences de délétion des huit YAPs effectuées dans notre laboratoire ont montré qu'aucune des ces dernières ne participent à l'activation de la transcription d'*IMP2*. Cela laisse penser à l'existence d'autre(s) protéine(s), **IPF** (*IMP2 Promotor Factor*) qui aurait comme fonction la reconnaissance de la séquence promotrice IPE et l'activation de la transcription d'*IMP2*.

5-2 Structure d'Imp2

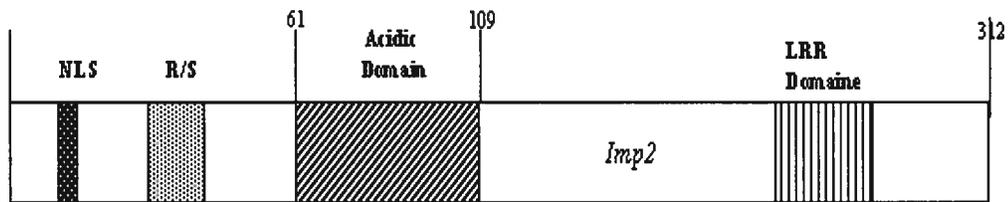


Figure5 : Structure d'Imp2

Imp2 est un cofacteur de transcription de 40 KDa constitué de trois domaines fonctionnels (Masson et Ramotar, 1996):

- Domaine acide (entre les acides aminés 61 et 109)
- Domaine N-terminal riche en arginine et serine qui semble pour la phosphorylation d'Imp2.
- Domaine C-terminal avec une région riche en leucine répétée (LRR). Cette région est similaire à celle observée chez d'autres

protéines permettant l'interaction protéine-protéine (Kobe et al, 1994).

5-3 Fonction d'Imp2

Imp2 est un activateur de transcription qui active l'expression de plusieurs gènes impliqués à la fois dans la régulation du stress oxydant, osmotique et thermique, ainsi que la régulation du métabolisme de maltose, de raffinose et de galactose.

5-3-1 Imp2 et la régulation du métabolisme de maltose raffinose et galactose

L'équipe du Dr Donnini a montré, par des expériences de mutagenèse dirigée, que les mutants *Imp2Δ* ne peuvent pas croître dans un milieu dont la source de carbone est le galactose, le maltose ou le raffinose. Imp2 est impliqué dans le métabolisme de ces sucres par l'activation de la transcription du galactose perméase, la maltose perméase et la maltase (Lodi *et al*, 1995).

Imp2 est impliqué aussi dans l'activation de transcription des gènes requis lors d'une dérépression rapide du glucose après un changement de milieu de culture contenant du glucose ou un milieu de culture avec du galactose. Cette régulation de transcription du gène GAL 4 par Imp2 se fait via Mig1 (Alberti *et al*, 2003).

5-3-1 Imp2 et la régulation du stress cellulaire

Notre laboratoire a également montré que Imp2 est impliqué dans la régulation du stress causé par certains agents oxydants, tels que la bléomycine (BLM) et H₂O₂. Imp2 est essentiel à la fois pour résister au stress osmotique et au stress thermique.

- *Imp2 et la résistance à la BLM*

La BLM est un médicament antitumoral qui agit par une génotoxicité capable de bloquer la croissance des cellules cancéreuses. Cependant certaines cellules acquièrent une résistance à la BLM par un mécanisme qui n'est pas encore connu.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, *Imp2* est essentiel pour la résistance à la BLM. Notre laboratoire a montré pour la première fois que les mutants *Imp2Δ* sont hypersensibles aux agents endommageant l'ADN comme la BLM et H₂O₂ (Ramotar et Masson, 1996). En même temps ces mutants *Imp2Δ* sont insensibles aux agents UV 250 nm et au 4-NO.

Si le mécanisme de résistance à la BLM n'est pas encore bien élucidé, il semble que *Imp2* comme activateur de transcription serait impliqué dans l'expression des gènes de réparation de dommage causé par BLM et H₂O₂ et non par d'autres agents endommageant l'ADN comme l'UV 250 nm et 4-NO.

- *Imp2 et l'équilibre ionique*

L'équilibre homéostatique des ions est très important pour la cellule afin de maintenir leur volume stable. Tout déséquilibre ionique peut entraîner une perturbation et par conséquent mettre en cause la viabilité cellulaire (Alberti *et al*, 1995). Cet équilibre est assuré à la fois par un système à pompe ionique et par un système à transport membranaire.

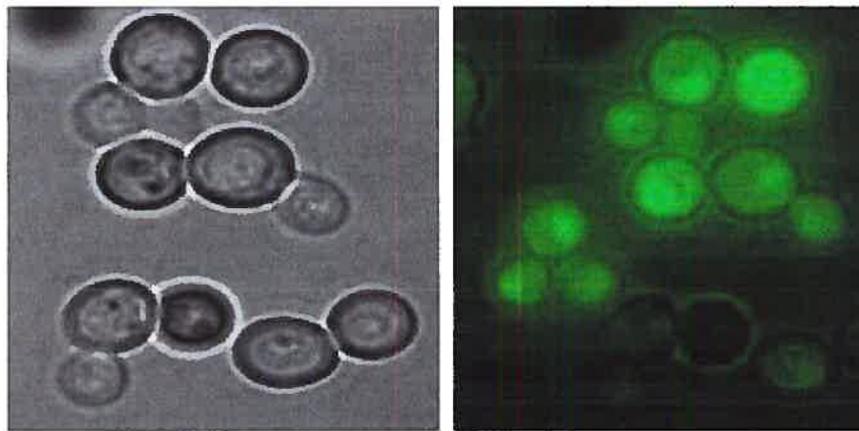
Imp2 est également impliqué dans la régulation de cet équilibre homéostatique (Masson et Ramotar, 1997). Les mutants de levure *Imp2Δ* sont hypersensibles à des changement de concentration des ions monovalents tels que Na⁺ et Li⁺ et des ions

divalents tels que Mn^{2+} , Cu^{2+} et Ca^{2+} (Masson et Ramotar, 1997). D'autres résultats ont montré l'importance d'Imp2 pour la résistance au stress causé par un pH basique (Ramotar, résultats non publiés).

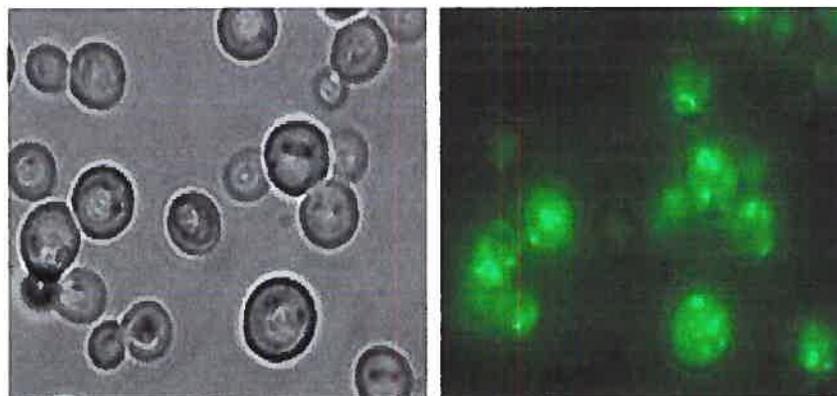
- *Imp2 et le stress thermique*

Plusieurs équipes (Donnini *et al*, 1992), (Ramotar *et al*, 1996) ont remarqué que Imp2 est impliqué aussi dans la régulation du stress thermique.

Après transformation de levures par un plasmide pGFP-IMP2 afin de localiser Imp2, nous avons constaté que dans les conditions normales de croissance, Imp2 est localisé dans le noyau. Cependant un choc thermique de 42°C pendant 15 min, montre une relocalisation de Imp2, et constitue des amas fluorescents dans le cytoplasme (figure 6). Un tel phénomène est réversible.



Condition Normale (30°C)



Condition de stress thermique (42°C)

Figure 6 : L'observation par microscope à fluorescence, après la transformation d'une souche sauvage (wt) par plasmide *pGFP-IMP2*. Dans la situation normal, Imp2 se localise dans le noyau (cofacteur de transcription), alors que dans les conditions de stress thermique, Imp2 sorte de noyau et se localise dans le cytoplasme. Imp2 est impliqué dans la regulation de stress thermique.

➤ *L'importance d'Imp2*

Imp2 est un cofacteur de transcription qui intervient dans plusieurs mécanismes de contrôle cellulaire: condition de croissance (source de carbone), condition de stress (temperature, pH, éléments ioniques, agents oxydants tel que BLM).

Aucune protéine homologue de structure à Imp2 n'a été identifiée chez les mammifères. Cependant il semble qu'il y ait un homologue fonctionnel pouvant remplir les mêmes fonctions citées ci-dessus.

6. La bléomycine

6-1 La structure :

La BLM est un glycopeptide à 3 domaines fonctionnels: (voir fig7)

- Le domaine de liaison aux métaux comme le Fer dans la partie N-terminale.
- Le domaine de liaison à l'ADN en C-terminal.
- La partie hydrate de carbone

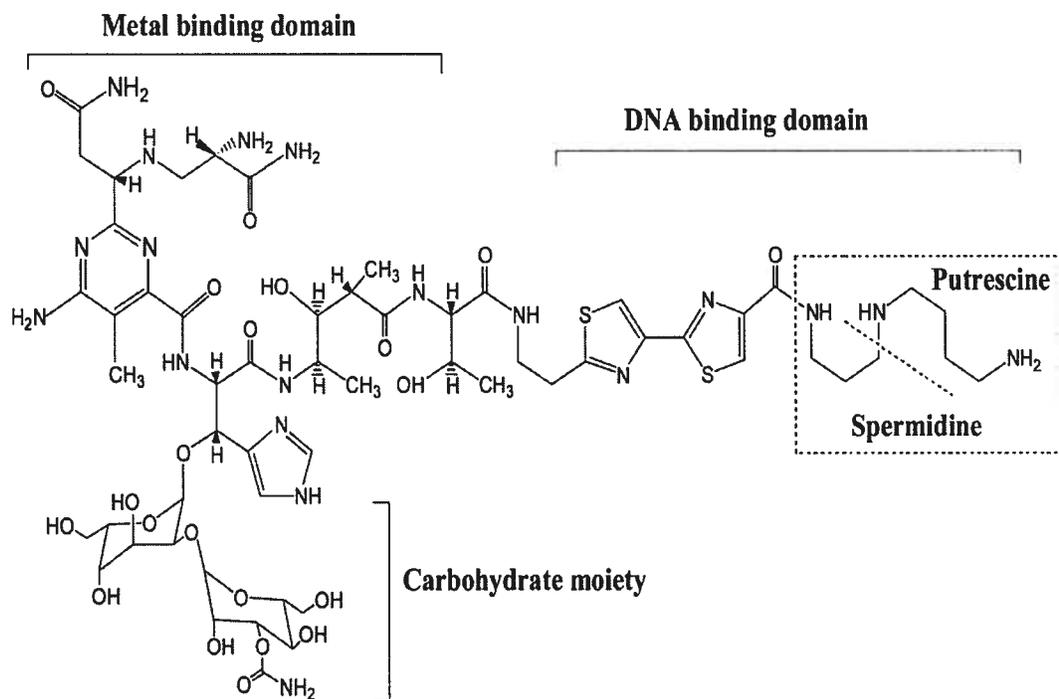


Figure 7 : Structure de la BLM et ses domaines fonctionnels (Richard Giegé et al 1996).

C'est un médicament anticancéreux, isolé au Japon à la fin des années 1960, à partir d'une bactérie *Streptomyces* (Umezawa *et al*, 1966). C'est un antibiotique qui provoque des cassures de l'ADN après production de radicaux libres et bloque ainsi le fonctionnement de la cellule.

6-2 L'effet toxique de la BLM

La BLM sous forme inactive interagit avec la molécule d'oxygène O_2 , l'ion ferrique Fe^{2+} , l'ion Fe^{3+} et l' H_2O_2 pour former un complexe actif qui va agir comme un oxydant et attaquer certaines macromolécules comme l'ADN (Band Horwitz *et al* 1981) (voir fig 8).

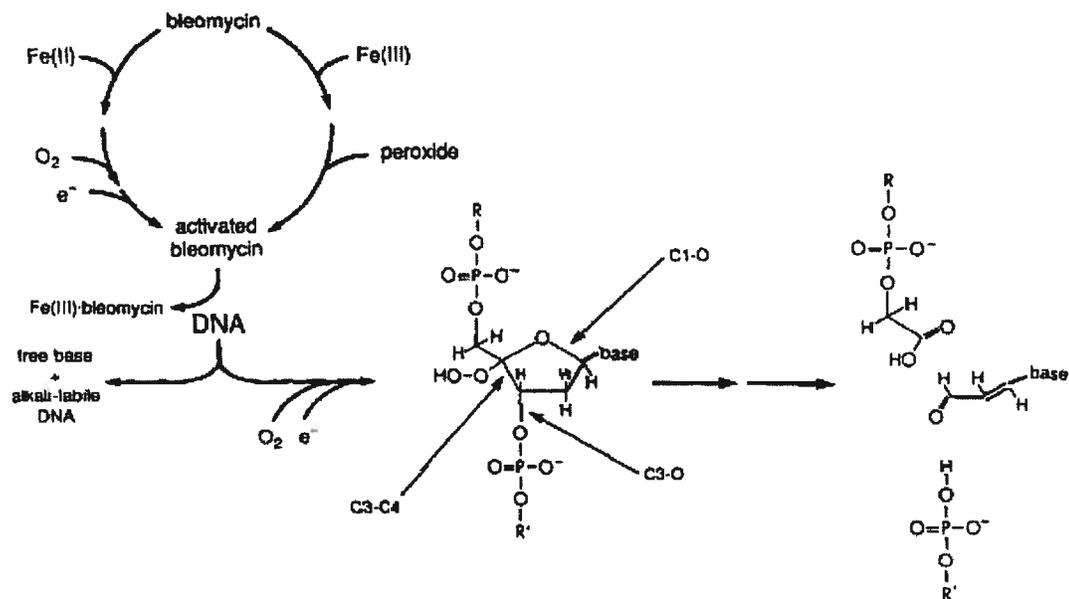


Figure 8 : Mécanisme d'activation de la BLM (Burger *et al*, 1994)

Donc, en présence de certains ions redox comme le Fe^{2+} et l'oxygène, la molécule de BLM devient active et provoque des cassures de certaines macromolécules biologiques telle que l'ADN (Burger et al, 1994), (Worth et al, 1993).

La fixation de la BLM sur l'ADN peut engendrer trois types de dommages (Kozariche et al, 1993)

- Oxydation des sites abasiques (AP)
- Cassure d'ADN simple brin avec des extrémités 3' phosphoglycoates
- Cassure d'ADN double brin

En plus de l'ADN, il a été montré que la BLM peut endommager d'autres macromolécules comme l'ARN (Carter et al, 1990) ainsi que la paroi cellulaire (Lipke et al, 1993).

6-3 BLM est un médicament antitumoral

(Fiche médicale)

La BLM est utilisée dans le traitement de plusieurs variétés de cancer. Elle peut s'administrer par voie veineuse ou artérielle mais aussi intramusculaire ou par injection locale dans la plèvre ou le péritoine (Crooke *et al*, 1977). On l'utilise habituellement à une dose de 10 mg/m², une à deux fois par semaine. Au-delà d'une dose totale cumulée de 200 mg/m², il y a risque d'apparition d'une fibrose pulmonaire (Adamson et Bowden, 1974) irréversible, susceptible d'entraîner une insuffisance respiratoire et une asphyxie mortelle.

La BLM n'est pas toxique pour les cellules de la moëlle osseuse et du sang. (Vijayalaxmi, et al, 1989). Son injection s'accompagne souvent d'une fièvre et de frissons violents qui doivent être évités par une préparation médicamenteuse. La prolongation du traitement se traduit par des troubles de la peau et des muqueuses : épaisissements et pigmentation aux coudes, aux genoux et sur les paumes des mains et les plantes des pieds, rougeurs diffuses, irritation de la bouche (stomatite) et des muqueuses digestives gênant l'alimentation (dysphagie).

Cette toxicité traduit son affinité pour les revêtements (épithéliums) qui la rend efficace sur les carcinomes épidermoïdes des voies respiratoires (Jules-Elysee *et al*, 1990) des muqueuses génitales et de la peau. Elle est également utile dans les cancers du testicule et dans les lymphomes malins (maladie de Hodgkin et autres lymphomes) (Lazo *et al*, 1996), (Povirk et Austin, 1991)

6-4 La résistance à la BLM

Certaines tumeurs acquièrent une résistance à la BLM, par un mécanisme mal connu.

La résistance des tumeurs à des médicaments antitumoraux tels que la BLM est un grand problème dans le traitement du cancer par la chimiothérapie.

Plusieurs mécanismes de résistance à la BLM ont été proposés, comme la réparation de l'ADN et la dégradation de la BLM par BLM-hydrolase, une protéase qui métabolise la BLM et termine son activité pharmacologique.

Une étude de criblage des mutants sensibles à la BLM chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, (Tableau III) effectué dans notre laboratoire (Aouida et al, 2004), a permis d'isoler une vingtaine de gènes impliqués dans la sensibilité à la BLM.

Aussi on a pu isoler d'autres gènes offrant une résistance de la levure à la BLM tel que AGP2. Ce dernier code pour une protéine membranaire impliquée dans le transport de la BLM.

7. Problématique et but de mon projet de recherche

7-1 Problématique et objectifs

La résistance aux tumeurs constitue le fardeau majeur jusqu'à présent dans le traitement du cancer par la thérapie chimique.

Imp2 est directement impliquée dans la résistance de la levure à la BLM, mais on ne sait pas par quel mécanisme elle arrive à offrir cette résistance.

Le(s) facteur(s) de transcription qui régule son expression ne sont pas identifiés.

Notre but est d'identifier le(s) activateur(s) de transcription de IMP2 et de comprendre la régulation d'expression de Imp2, afin de mieux comprendre son mécanisme d'action.

7-2 La stratégie

Pour répondre à notre objectif mentionné ci-dessus, on a tiré profit des études de criblage des mutants sensibles à la BLM qui ont été effectuées dans notre laboratoire (voir Tableau III).

Parmi les mutants isolés, nous avons ciblé pour cette étude ceux qui sont impliqués dans la transcription générale (voir Tableau III). Notre hypothèse est que sont mutés pour le(s) facteur(s) de transcription d'Imp2. Dans ce(s) mutant(s) il y aurait une faible expression d'Imp2 qui rend la souche sensible à la BLM. La stratégie consiste en l'utilisation de plasmide contenant un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur *IMP2* (IPE) suivi d'autres tests pour cribler le facteur de transcription d'*IMP2*.

<i>DNA repair and chromatine structure</i>	<i>Transcription</i>	<i>Cell cycle</i>	<i>RNA metabolisme</i>	<i>Protein synthesis</i>
<i>CTF18^{*a}</i>	<i>ASF1</i>	<i>CDC50</i>	<i>ARC1</i>	<i>ASC1</i>
<i>CTF4</i>	<i>BUR2</i>	<i>CTK2</i>	<i>BRE5</i>	<i>EAP1</i>
<i>CTF8</i>	<i>CCR4</i>	<i>DOC1</i>	<i>BRF1</i>	<i>EGD2</i>
<i>EST2</i>	<i>CTK1</i>	<i>HTL1</i>	<i>CDC40</i>	<i>PDR13</i>
<i>FAB1</i>	<i>CTK3</i>	<i>PHO85</i>	<i>DBP7</i>	<i>PFD1</i>
<i>IWR1</i>	<i>DHH1</i>	<i>RTS1</i>	<i>DIA4</i>	<i>RPL13B</i>
<i>MRE11</i>	<i>GAL11</i>	<i>SFP1</i>	<i>KEM1</i>	<i>RPL1B</i>
<i>NAT3</i>	<i>IMP2</i>		<i>LOC1</i>	<i>RPL27A</i>
<i>RAD27</i>	<i>KCS1</i>		<i>PAT1</i>	<i>RPL35A</i>
<i>RAD54</i>	<i>POP2</i>		<i>SAC3</i>	<i>RPL39</i>
<i>RAD57</i>	<i>ROX3</i>		<i>SNT309</i>	<i>RPS0B</i>
<i>RAD6</i>	<i>RPB4</i>		<i>YER078W</i>	<i>TIF3</i>
<i>RAI1</i>	<i>RPB9</i>			<i>TIF4631</i>
<i>REM50</i>	<i>RRN10</i>			<i>ZUO1</i>
<i>RNR4</i>	<i>SIN4</i>			<i>TIF2</i>
<i>RNR1</i>	<i>SPT21</i>			
<i>SFF6</i>	<i>SPT7</i>			
<i>SPT10SPT20</i>	<i>SRB2</i>			
<i>THP1</i>	<i>SRB5</i>			
<i>TRF4</i>	<i>SRB8</i>			
<i>VID31</i>	<i>SSN8</i>			
<i>XRS2</i>	<i>SWI4</i>			
	<i>SWI6</i>			
	<i>TAF14</i>			

Tableau III : Un criblage des mutantes sensibles à la BLM chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Aouida et Ramotar, 2003).

II- Matériel et Méthodes

1. Les souches utilisées

1-1 Souches de levures (Aouida et al, 2004)

Nom de la souche	Génotype
<i>W.T 4741</i>	<i>Mat a; his3D1 leu2D0 met15D0 ura3D0</i>
<i>imp2Δ</i>	<i>Isogénique à 4741 excepté délété en IMP2Δ :: KamMX2</i>
<i>taf14Δ</i>	<i>Isogénique à 4741 excepté délété en TAF14Δ :: KamMX2</i>
<i>spt10Δ</i>	<i>Isogénique à 4741 excepté délété en SPT10Δ :: KamMX2</i>
<i>spt20Δ</i>	<i>Isogénique à 4741 excepté délété en SPT20Δ :: KamMX2</i>
<i>nat3Δ</i>	<i>Isogénique à 4741 excepté délété en NAT3Δ :: KamMX2</i>
<i>rrn4Δ</i>	<i>Isogénique à 4741 excepté délété en RNR4Δ :: KamMX2</i>
<i>rrn2Δ</i>	<i>Isogénique à 4741 excepté délété en RNR2Δ :: KamMX2</i>
<i>Iwr1Δ</i>	<i>Isogénique à 4741 excepté délété en Iwr2Δ :: KamMX2</i>
<i>snf6Δ</i>	<i>Isogénique à 4741 excepté délété en SNF6Δ :: KamMX2</i>
<i>trf4Δ</i>	<i>Isogénique à 4741 excepté délété en TRF4Δ :: KamMX2</i>
WT Imp2-myc	<i>Isogénique à 4741 avec le tag myc au Ct de imp2 :: LEU2</i>
<i>taf14Δ imp2-myc</i>	<i>Isogénique à taf14Δ avec le tag myc au Ct de imp2 :: LEU2</i>

1-2 Souches de Bactéries

Le nom de la souche	Génotype
DH5 5α	<i>sup.E 44 ΔlacU 169-80lacZ ΔM15 hsdR17 recA1 et A1gyrA96 thi-1 relA1</i>

2. Construction de plasmides

2-1 Construction de pIPR196

Le plasmide du promoteur *IMP2* fusionné au gène LacZ, pIPR (*IMP2* Promoter Region), a été construit comme suit: pIPR196 qui est dérivé de pIPR695 par coupure avec PstI, SphI et HindIII respectivement est suivie de la recirculation de plasmide (Masson et Ramotar, 1996). Les amorces JYM6 (5'-AAT CTT GTC GAC GAA CCA-3') et JYM15 (5'-CCC TGT GGC CGA ATT CCA TCTG CTC-3') qui contiennent respectivement les sites de restriction *SalI* et *EcoRI*, ont été utilisés pour amplifier un fragment de 695 pb qui contient une région du promoteur d'*IMP2* position (-695 à +17). Ce fragment a ensuite été sous cloné dans le vecteur multicopie YEP356R.

Dans cette étude, un autre plasmide a été utilisé comme contrôle négatif (Yep155) pour les analyses de l'expression de β -galactosidase.

2-2 Construction de pGFP-IMP2

IMP2 a été extrait à partir de pNlexA-*IMP2* par excision avec *EcoRI*/*SalI* et sous-cloné dans pGal-*GFP* grâce à une double digestion *EcoRI*/*XhoI*, donnant ainsi naissance au plasmide *pGFP-IMP2* (Masson et Ramotar, 1996). Après l'induction par le galactose, ce dernier va se lier au promoteur GAL pour permettre ainsi l'expression de *GFP-IMP2*.

2-3 Construction de pGST-TAF14

Le vecteur pYEX 4T est dérivé de pYEUL contenant le gène GST (Glutathione S-transférase) sous la dépendance du promoteur CUP1 induit par le cuivre et codant pour une protéine de 27.5 KDa. pYEX 4T contient le gène de sélection Amp^r pour la transformation bactérienne, et les gènes de sélection *LEU2-d* et *URA3* pour la transformation de levure.

pYEX 4T est utilisé comme vecteur d'expression à haut niveau de la protéine de fusion GST-Taf14 chez *Saccharomyces cerevisiae* selon les étapes suivantes (Martzen et al, 1999):

Étape 1

L'extraction de l'ADN génomique de levure, et l'amplification des séquences de *GST-TAF14* par PCR, en utilisant les amorces suivantes ;

YEX-TAF14-F

(5'-TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA CAA CCC AAA AAA AGA GAT CGA AAT GGT AGC TAC AGT AAA AAG- 3').

YEX-TAF14-R

(5'-TTC AGT ATC TAC GAT TCA TAG ATC TCT GCA GGT CGA CGG ATC CCC TTA CTC GGT ATT TTT CTT AAC-3').

Le programme de PCR est :

- 1-: 5min à 95 °C;
- 2-: 1min à 90 °C;
- 3-: 1min à 50 °C ;
- 4-: 1min à 72 °C ;
- 5-: 25 cycles des étapes 2 à 4;

6-: 5min à 72 °C.

Étape 2

Digestion du plasmide pYEX 4T avec les enzymes *EcoRI/SmolI* (les amorces que nous avons utilisées pour amplifier *GST-TAF14* contiennent les mêmes sites de restriction).

Étape 3

Co-transformation du produit de PCR (étape 1) et du vecteur pYEX4T coupé (étape 2), puis nous avons sélectionné les transformants sur un milieu sélectif – *URA* (beaucoup de colonies). Parallèlement nous avons fait un contrôle négatif sans produit de PCR (peu des colonies).

Nous avons vérifié l'expression de la protéine de fusion GST-Taf14 par immunobuvardage avec des anticorps anti-GST, et nous avons purifié parallèlement la protéine de fusion GST-Taf14 par chromatographie d'affinité avec sépharose glutathione.

2-4 Construction de IMP2-myc

Le plasmide pFA6a-MYC-TAG de 4.7Kb contient tag –MYC que nous avons utilisé pour construire le fragment Ct-IMP2-MYC. Notre but est de quantifier l'expression d'Imp2 par immunobuvardage, mais ne disposant pas d'anticorps anti-IMP2, nous avons inséré un tag-MYC à l'extrémité C-terminale d'Imp2 parce que l'activité fonctionnelle d'Imp2 est dans l'extrémité N-terminale. Ainsi nous pourrions quantifier l'expression de la protéine de fusion Imp2-Myc par immunobuvardage avec des anticorps anti-MYC.

Pour amplifier le fragment C-MYC-IMP2, nous avons utilisé les amorces suivantes :

C-MYC-IMP2 Dw:

5'-CAA GCG CAA GGG CAA TCA GCG CGG ATC CCC GGG TTA ATT AA-3'

C-MYC-IMP2 Up :

5'-CGC TGA TGC CCT TGC GCT TGG AAT TTC GAG CTC GTT TAA AC-3'

Le programme de PCR suivant :(1: 5min à 95 °C; 2: 1 min à 90 °C; 3: 1min à 58 °C; 4: 2 min 30s à 72 °C ;5: 25 cycle des étapes 2 à 3; 6: 5min à 72 °C). Le gel d'électrophorèse doit contenir un fragment de 2.1Kb.

La vérification de l'intégration par recombinaison homologue du fragment *IMP2-MYC* se fait par PCR.

3. La transformation

3-1 La transformation de levure

Le transfert d'un fragment d'ADN dans la levure s'est fait par la technique du choc thermique décrite par Ito (Ito *et al*, 1983) et Gietz (Gietz *et al*, 1992). Les levures inoculées dans 1 ml de milieu YPD ou du milieu minimal sélectif (exemple : -Ura, -Raf, -leucine) ont été cultivées toute la nuit à 30°C. Par la suite les levures ont été sous-inoculées en ajoutant 4 ml de milieu de culture toujours à 30°C durant 4 heures (pour avoir la phase de croissance exponentielle). Les cellules ont ensuite été centrifugées, lavées deux fois avec de l'eau stérile et une fois avec 1 ml de TE/LiAc (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7.5). Les cellules ont été centrifugées encore pendant 1 min à 12000 rpm, puis le culot de cellules a été resuspendu dans 50 µl de TE/LiAc (pour chaque transformation). Nous avons ajouté 50 µg d'ADN de sperme de saumon soniqué, de même que 1 µg de l'ADN à transformer, ensuite 300 µl de PEG/TE/LiAc (TE/LiAc 1x 40% PEG) ont été ajoutés. Les levures ont ensuite été incubées à 30 °C durant 2 heures puis nous avons fait un choc thermique de 15 min à 42 °C.

Après le choc thermique, les cellules ont été centrifugées puis resuspendu dans 70 μ l d'eau stérile et étalées sur un milieu approprié selon le marqueur de sélection (par exemple -URA).

3-2 Transformation des bactéries

La transformation des bactéries s'est faite suivant le protocole établi par Sambrook et al (1989). Les bactéries servant à cette manipulation sont des cellules compétentes d'*E. coli* de la souche DH5 α conservées à -80 °C.

Lors de la transformation, nous avons décongelé lentement sur la glace les cellules. L'un des tubes contenant des cellules seules a servi de contrôle négatif, alors que dans un second tube nous avons ajouté 50 ng d'ADN aux cellules à transformer. Après la transformation proprement dite (30 min sur glace, choc thermique à 42 °C pendant 1min 30 sec), les cellules sont remises à incuber à 37 °C pendant 1 heure dans 1 ml de milieu de culture LB (pour 1litre : 10 g de bacto-tryptone, 5 g yeast extract, 10 g de NaCl). Les cellules ont ensuite été centrifugées et resuspendues dans 100 μ l de LB puis étaler sur un milieu sélectif contenant l'antibiotique (Ampicilline).

4. L'extraction des protéines

Les souches ont poussé toute la nuit dans un milieu de culture YPD à 30 °C. Après centrifugation et lavage deux fois dans de l'eau stérile, le culot de cellules a été suspendu dans le tampon d'extraction protéique (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, 5% glycérol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 μ g/ml d'Aprotinine et 0.5 μ g/ml de Leupeptin), puis broyé dans un mini-beadbeater (5000 rpm pendant 20 secondes, 5 fois), en utilisant les billes Zirconia-Silica (0.5 mm). Les billes sont enlevées par une centrifugation à 2000 rpm pendant une minute puis les extraits protéiques ont été

conservés à -80 °C. Par la suite, la concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford.

Il faut noter que les souches transformées avec un plasmide, pIPR196 par exemple, s'effectue en milieu minimum sélectif (-Ura par exemple) toute la nuit. Quatre heures avant l'extraction des protéines, nous avons induit l'expression du gène cible en ajoutant 0.5% de galactose car notre gène d'intérêt est sous le contrôle du promoteur Gal.

5. *Les analyses de β -galactosidase*

Une fois les protéines extraites, nous avons déterminé leur concentration par la méthode de Bradford, puis nous avons pris 40 μ l de protéines de chaque souche auxquelles on a ajouté 1 ml de tampon Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM 2-mercaptoéthanol, pH 7.0). Par la suite, nous avons ajouté 200 μ l de ONPG (pour obtenir la concentration de 4 mg/ml dans 0.1 M de tampon de phosphate de potassium, pH 7, on fait la stérilisation par filtration). Les échantillons ont ensuite été placés à 30 °C jusqu'à l'apparition d'une teinte jaunâtre, à ce moment là 500 μ l de carbonate de sodium (1 M) ont été ajoutés à la solution pour arrêter la réaction.

Nous avons mesuré la densité optique à 420 nm et à 550 nm et nous avons appliqué la formule suivante (MILLER *et al*, 1959) :

$$\text{Unité} = 1000 \times \frac{(\text{DO}_{420} - 1.75 \text{DO}_{550})}{\text{Temps de l'apparition teinte jaunâtre} \times \text{Protéines en mg}}$$

6. *Marquage des sondes*

La sonde YAP : (5'-AAG AGC ATA TTG CTG ACT AAA CTG ACG GAA- 3') contenant la séquence IPE (TGACTAA) a été purifiée sur 6% d'acrylamide/bis (29 :1). La sonde purifiée (100 ng) fut ensuite marquée à l'extrémité 5' par la T4 polynucleotide kinase (10 U, Promega) dans un tampon composé de 70 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 100 µCi [γ -³²P] ATP (5000 Ci/mM, Amersham) et incubée à 37 °C pendant 2 heures. La même technique de marquage fut appliquée à la sonde JYM15 (5'-CTC AAG CTG AGC CTC GTC TAC CTT TCC CCG GTG GTC CC-3') utilisée pour l'expérience de l'extension par amorce.

Pour le Northern blot, nous avons marqué la sonde à l'extrémité 5' par la technique du Random Priming (¹⁷QuickPrime™ Kit) avec la T7 DNA polymerase. Après dénaturation de la sonde (fragment de 50 ng d'ADN d'*IMP2* préparé par PCR), nous avons ajouté le tampon LABELLING MIX (préparé par le fabricant) ainsi que du ³²P α -dCTP selon les indications du fabricant. Ensuite, nous avons fait la précipitation de la sonde et le comptage de la radioactivité. Dans nos expériences, nous avons utilisé l'équivalent de 10⁶ CPM.

7. *Extraction des ARN et Northern blot*

Pour l'extraction de l'ARN total, nous avons appliqué le protocole établi par Schmid (Schmitt *et al*, 1990). Brièvement, 7 ml de milieu de culture YPD ont été ajoutés aux 8 ml des cellules ayant poussé toute la nuit (pour avoir la phase exponentielle de croissance). Les cellules ont été centrifugées, lavées dans 1 ml d'H₂O sans RNase, et suspendues dans 650 µl de tampon AE (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 0.5% SDS), et 500 µl de phénol acide. Nous avons laissé l'échantillon dans une plaque chauffante de 65 °C à 70 °C pendant 1 heure en vortexant toutes les 10 min.

Après l'extraction phénol-chloroforme, les ARNs furent précipités par éthanol. Toutes les solutions étaient sans RNase. Nous avons quantifié ensuite la concentration d'ARN extrait en mesurant la densité optique à 260 nm.

Une fois l'ARN total purifié, nous avons pris 25 µg de chaque échantillon pour l'électrophorèse sur un gel d'agarose 1.8% (TBE), puis l'ARN a été transféré sur une membrane de nylon (Amersham). La membrane a été incubée pendant toute la nuit à 55 °C dans le tampon de préhybridation (50% formamide, 0.1% SDS, 50 mM de tampon de phosphate de sodium pH 6.5, 5x SSC, 0.1% pyrophosphate de sodium, 100 µg/ml de l'ARNtet 250 µg/ml de l'ADN de sperme de saumon dénaturé).

Directement après l'étape de préhybridation, la membrane a été incubée toute la nuit avec la sonde correspondant à IMP2 (avec sonde d'actine comme contrôle interne) à 55 °C dans le tampon d'hybridation (préparé par fabricant Random Priming - ³²P-QuickPrime™).

Avant l'exposition, la membrane a été lavée quatre fois, deux fois avec une solution de 1x SSC/0.1% SDS pendant 15 min à la température ambiante et deux fois avec la solution 0.2 x SSC/0.1% SDS pendant 30 min à 65 °C. Enfin la membrane a été exposée sur un film (Kodak) pendant 48 heures à -80 °C avant le développement.

8. Expérience de retard sur gel

Nous avons utilisé trois quantités de protéines; 10 µg, 20 µg et 50 µg. Ces protéines ont été incubées à la température ambiante pendant 20 min dans 24 µl de milieu réactionnel contenant 10 mM Hepes. KOH, pH 7.9, 1 M KCl, 10% glycérol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1µg/ul de poly dIdC (Pharmacia) et 20000 cpm de la sonde (IMP2). Le même tampon a été utilisé avec la sonde froide en tant que compétiteur. Après l'incubation, les échantillons ont immédiatement été déposés sur un gel de 6%

d'acrylamide/bis (39 :1) dans un tampon de Tris-glycine-EDTA. La migration a été effectuée 120 V pendant cinq heures à 4 °C.

Après la migration, le gel a été transféré sur un papier Wattman, séché et exposé sur un film (BioMax, Kodak) pendant toute la nuit.

9. Courbe de survie

Après une nuit en milieu sélectif (-Ura), les cellules ont été centrifugées et la culture reprise dans un milieu YPD (la BLM n'est pas active dans un milieu -Ura). Quatre heures après l'induction des cellules par 0.5% de galactose, nous avons compté le nombre des cellules en mesurant la densité optique à DO_{600} . Une fois une $DO_{600} = 1(10^6$ des cellules par ml atteinte), nous avons commencé le traitement avec la BLM.

Dans des tubes, nous avons mis l'équivalent de 10^6 des cellules, auxquelles ont été ajoutés 25 $\mu\text{g/ml}$ de BLM, puis nous avons réalisé deux dilutions successives: 1/20 (100 μl de culture dans 5 ml d'eau stérile) et 1/40 (100 μl de la 1^{ère} dilution dans 5 ml d'eau stérile), puis nous avons étalé 100 μl de la 2^{ème} dilution sur des pétris contenant du milieu YPD.

Nous avons fait la même chose pour les autres cultures après 15, 30, 45 et 60 min. Les pétris ont été incubés à 30 °C, puis le nombre des colonies a été compté.

10. Extension par amorce

Pour déterminer le site d'initiation de la transcription d'*IMP2*, nous avons utilisé la méthode de l'extension par amorce. Après l'extraction des ARNs totaux, nous avons pris 80 μg d'ARN, 2 μl de tampon (25 mM Tris pH 8.3, 375 mM KCl, 5 mM EDTA), l'équivalent de 400000 cpm de la sonde (JYM15). Après avoir porté l'ensemble à l'ébullition, nous avons laissé refroidir pendant 45 min à 48 °C pour permettre à la sonde

JYM15 d'hybrider avec l'ARNm de *IMP2* grâce au refroidissement lent. Par la suite, l'ensemble a été centrifugé et reçut 20 µl du mélange synthétique et de reverse transcriptase : 4 µl de 5x tampon synthétique (250 mM Tris pH 8.3, 375 mM KCl, 22.5 mM MgCl₂, 75 mM DTT), 0.3 µl de dNTP (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 14.3 µl d'H₂O, 0.5 µl de M-MLV Reverse Transcriptase (200 unités/µl). Après 30 min à 37 °C, l'ADN a été précipité à l'éthanol puis resuspendu dans 5 µl TE, Avant la migration sur gel de séquençage (Urea/acrylamide), nous avons ajouté 5 µl de formamide et 5 µl de solution stop (Amersham) à l'ADN précipité.

Pour le séquençage de *IMP2*, 2M de NaOH a été ajoutés à 5 µg de plasmide pDR1049 (pour un volum final de 10 µl) contenant la partie promotrice de *IMP2*, puis après 10 min l'ADN a été précipité à éthanol. L'ADN précipité nous avons ajouté 50 nM de la sonde froid (JYM15), 1µl de [³⁵S dCTP], 1.6 µl de tampon (Amersham) et 0.5 µl de l'enzyme T7polymerase. Le mélange a été laissé 5 min à la température ambiante.

2.5 µl de nucléotide A, T, C, G (kit d'Amersham) ont été répartis dans 4 tubes, auxquels nous avons ajouté 4.5 µl de milieu réactionnel. Les tubes furent ensuite laissés à 37C° pendant 5min, puis reçurent 5 µl de solution stop. L'échantillon est chauffé avant la migration sur gel de séquençage.

11. Immunobuvardage

Pour quantifier l'expression de la protéine Imp2 dans les souches *wt* et *tafl4Δ*, nous avons utilisé la technique d'immunobuvardage décrite par (Gershoni *et al*, 1983). Les cellules ont été mises en culture pendant une nuit sur un milieu sélectif et l'extraction des protéines a été réalisée comme cité précédemment.

Nous avons pris 100 mg de protéines pour la migration sur gel de polyacrylamide SDS-page 8% (120 V). Après la migration, nous avons fait le transfert sur une membrane de nitrocellulose (Amersham) pendant la nuit à 4 °C avec un voltage de 25 v

La qualité de transfert a été vérifiée par le rouge de Ponceau qui établit l'égalité des quantités de matériel utilisé. Par la suite, la membrane a été lavée avec de l'eau pendant 1 min pour retirer le rouge de Ponceau, puis bloquée avec 5% de lait et TTBS (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA et 1% de Tween) pendant 1 heure. Après, nous avons ajouté l'anticorps primaire (1/2000 pour anti-Myc et 1/5000 pour anti-GST) et incubé pendant la nuit à 4 °C.

Le lendemain, la membrane a été lavée 5 fois, 1x 15 min et 4 x 5 min dans le TTBS (30 ml). L'anticorps secondaire (1/25000) a alors été ajouté pendant 1 heure à la température ambiante, puis la membrane a de nouveau été lavée par quatre séries de lavage avec de TBSET. La membrane fut ensuite traitée avec 2 ml du substrat chémiluminescent (ECL) pendant 1 min afin de déclencher la réaction lumineuse, et la révélation des bandes a été faite par autoradiographie.

III-Résultats

1. La quantification de l'expression du gène rapporteur IPE-LacZ dans les différentes souches sensibles à la BLM :

Des études précédentes avec la β -galactosidase effectuées dans notre laboratoire (données non publiées) ont montré la présence d'une région d'ADN (TGACTAA) en amont du gène *IMP2* indispensable à l'expression de ce gène; cette région est nommée IPE (*IMP2* promoter element). Nous ne connaissons pas les facteurs de transcription Ipf (*IMP2* promoter factor) qui interagissent avec cette région pour activer la transcription d'*IMP2*. À partir d'un criblage des mutants sensibles à la BLM (voir tableau III), nous avons choisi certaines souches mutantes qui portent une mutation au niveau des activateurs de transcription pour faire des expériences de β -galactosidase avec le gène rapporteur *IPE-LacZ* qui contient le promoteur de *IMP2* fusionné au gène LacZ. (pIPR196).

Les différentes souches de levures a été transformées par le plasmide et les niveaux d'expression du gène rapporteur a été mesurés. Le tableau V montre les résultats que nous avons trouvés. Nous nous sommes intéressées aux souches qui présentent les niveaux d'expression de β -galactosidase les plus bas (moins de 50% des niveaux obtenu avec la souche sauvage). Il s'agit des souches : *snf6* Δ , *iwr1* Δ , *taf14* Δ , *spt10* Δ , *rnr1* Δ , et *rnr4* Δ . Parmi ces souches, il y a vraisemblablement l'activateur de la transcription d'*IMP2*. En effet, ces souches présentent des niveaux de β -galactosidase très bas par rapport à la souche sauvage, ce qui révèle un problème soit au niveau de l'activation du promoteur d'*IMP2* (IPE), soit au niveau de la traduction de l'ARNm.

IPE
 TGACTAA

IMP2

Promoteur de *IMP2*

Les mutants sensibles à la BLM	Le niveau de β -galactosidase U/mg de protéine	
	Avec le pourcentage	
WT	600	100%
<i>spt10</i> Δ	531	88%
<i>trf4</i> Δ	462	77%
<i>nat3</i> Δ	456	76%
<i>est2</i> Δ	406	67%
<i>snf6</i> Δ	239	39%
<i>iwr1</i> Δ	225	37%
<i>taf14</i> Δ	200	33%
<i>spt10</i> Δ	160	26%
<i>rnr1</i> Δ	154	25%
<i>rnr4</i> Δ	75	12%

Tableau IV: La quantification des niveaux d'activité de la β -galactosidase dans les différents mutants sensibles à la BLM (n=5 et écart type $\sigma \pm 15$)

2. *Étude de la sensibilité des souches en condition de stress*

Comme il a été avancé, *IMP2* est indispensable pour la résistance au stress causé par la BLM, le NaCl, le CaCl₂, ainsi que les conditions de pH basique. Les mutants *snf6Δ* et *iwr1Δ* sont sensibles à la BLM mais pas aux autres agents comme NaCl, le CaCl₂, et un pH basique.

Les quatre autres mutants qui ont montré le niveau le plus bas de β-galactosidase ont été testés afin de déterminer leur sensibilité vis-à-vis de la BLM, du NaCl, du CaCl₂, et d'un pH basique.

2-1 Sensibilité à la BLM

Par l'expérience d'essai en spot, nous avons confirmé la sensibilité des souches vis-à-vis de la BLM. Nous savons qu'elles sont toutes sensibles à la BLM puisque le point de départ est un criblage des mutants sensibles à la BLM.

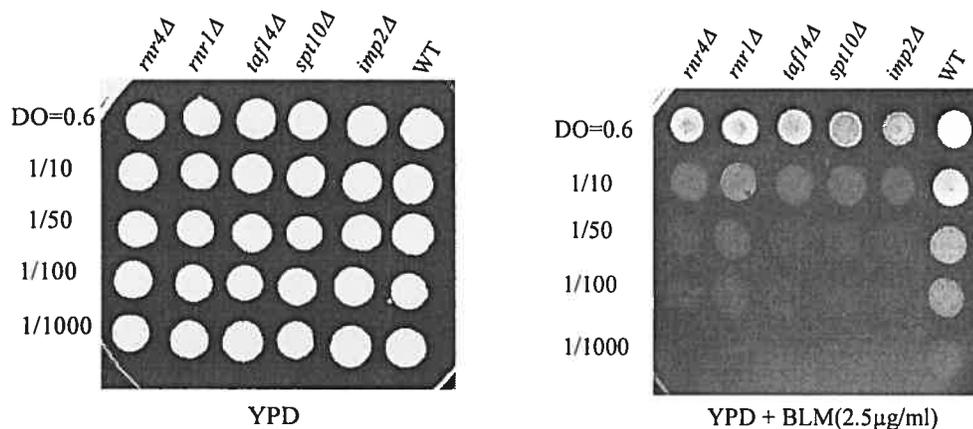


Figure 9 : Essai en spot mesurant la sensibilité à la BLM (2.5 μg/ml) de la souche sauvage (wt) et des souches mutantes *imp2Δ*, *rnr4Δ*, *rnr1Δ*, *taf14Δ*, *spt10Δ*. Toutes les mutantes sont sensibles à la BLM par rapport à la souche sauvage (wt).

Nos résultats confirment que toutes les souches sont sensibles à la BLM (Figure 9). Dans le milieu YPD, toutes les souches ont bien poussé alors que dans un milieu YPD + 2.5 µg/ml de BLM, nous remarquons une sensibilité de toutes les souches mutantes par rapport à la souche sauvage.

2-2 La sensibilité au NaCl

Nous savons que le mutant *imp2Δ* est sensible au NaCl (Masson et Ramotar, 1997). En absence de l'activateur de la transcription d'*IMP2*, ce dernier va être très peu exprimé et la souche va être relativement sensible au NaCl. Nous avons étudié la sensibilité au NaCl des quatre souches et la figure 10 présente les résultats obtenus.

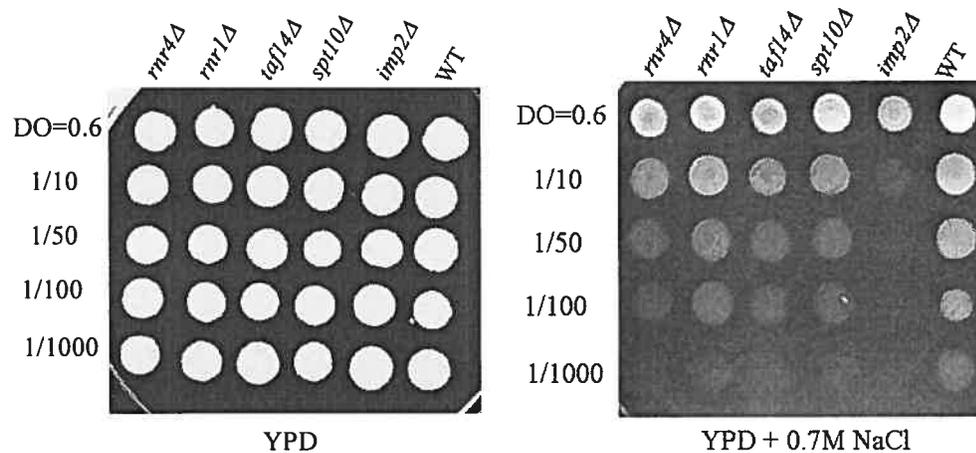


Figure 10 : Essai en spot mesurant la sensibilité au NaCl (0.7 M) de la souche sauvage (wt) et les souches mutantes *imp2Δ*, *rnr4Δ*, *rnr1Δ*, *taf14Δ*, *spt10Δ*. Les souches mutantes *imp2Δ*, *rnr4Δ*, *taf14Δ* et *spt10Δ* sont sensibles au NaCl par rapport à la souche sauvage (wt).

Nous pouvons remarquer que les souches *rnr4Δ*, *taf14Δ* et *spt10Δ* sont les plus sensibles au NaCl par rapport à la souche sauvage (wt) alors que la souche mutante *imp2Δ* (contrôle négatif) est la plus sensible des tous les autres mutants. Par conséquent, au moins l'une des trois protéines Rnr4, Spt10 ou Taf14 est potentiellement l'activateur de la transcription d'*IMP2*.

2-3 La sensibilité au stress osmotique

Les travaux de Ramotar et Masson (1997) ont montré que le gène *IMP2* est important pour la résistance au stress osmotique causé par le CaCl_2 et que le mutant *imp2Δ* est extrêmement sensible à ce même stress. Nous avons donc étudié la sensibilité des quatre mutants au CaCl_2 et la figure 11 présente les résultats obtenus.

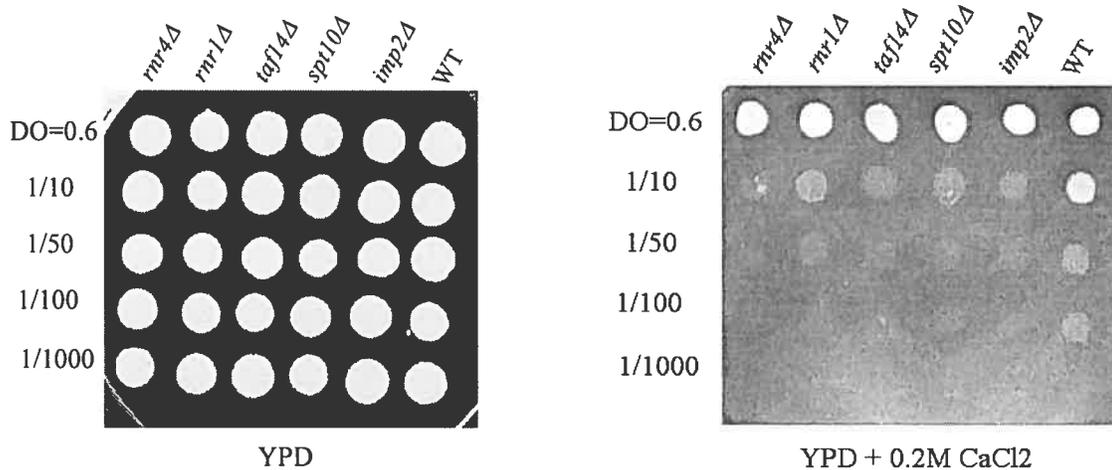


Figure 11 : Essai en spot mesurant la sensibilité au stress osmotique (0.2 M de CaCl_2) de la souche sauvage (wt) et des souches mutantes *imp2Δ*, *rnr4Δ*, *rnr1Δ*, *taf14Δ*, *spt10Δ*. Les mutants *imp2Δ*, *rnr4Δ* et *taf14Δ* sont les plus sensibles au stress osmotique par rapport à la souche sauvage (wt).

Les souches mutantes *rnr4Δ* et *taf14Δ* sont les plus sensibles au stress osmotique causé par le CaCl_2 par rapport à la souche sauvage (wt), et donc Taf14 ou Rnr4 est probablement l'activateur de transcription d'*IMP2*.

2-4 La sensibilité au pH basique

Pour terminer notre étude sur la sensibilité liée à *IMP2*, nous avons mesuré la sensibilité des souches mutantes au pH basique. Nous savons que les mutants *imp2Δ* sont sensibles au pH basique, donc les souches mutantes au niveau des activateurs de transcription potentiels d'*IMP2* devraient être aussi sensibles au pH basique. Nous avons étudié la sensibilité à pH 10 des quatre souches et la figure 12 présente les résultats obtenus.

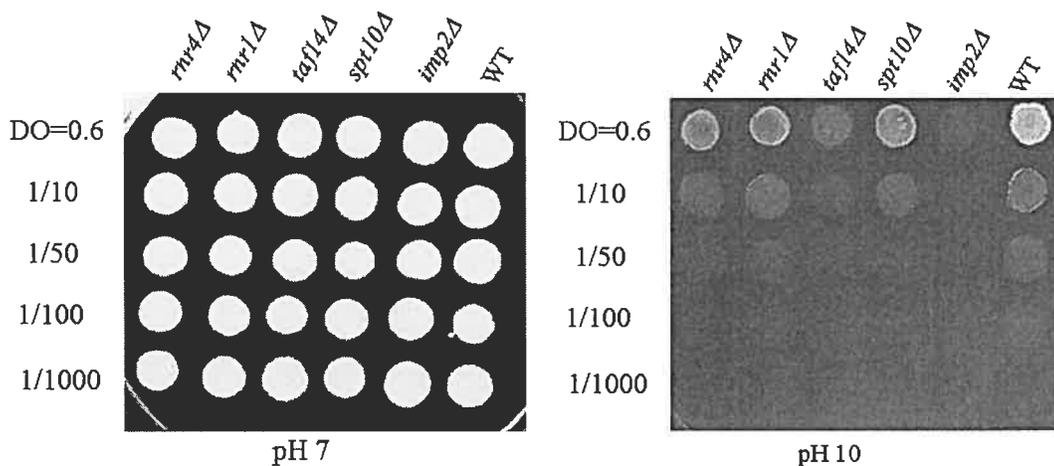


Figure 12 : Essai en spot mesurant la sensibilité au pH basique (pH10) de la souche sauvage (wt) et des souches mutantes *imp2Δ*, *rnr4Δ*, *rnr1Δ*, *taf14Δ* et *spt10Δ*.

taf14Δ et *imp2Δ* ont présenté pratiquement le même phénotype, et ces deux mutants ont une grande sensibilité au pH basique par rapport à la souche sauvage. Par conséquent, Taf14 semble être un candidat très plausible pour être le facteur de transcription d'*IMP2*.

3. *Taf14* semble impliqué dans l'expression d'IMP2

Pour étudier l'hypothèse que Taf14 est bel et bien le facteur de transcription d'IMP2, nous avons quantifié l'expression de l'ARNm d'IMP2 par analyse de type Northern. De plus, l'expression de la protéine de fusion Imp2-myc a été déterminée par immunobuvardage dans les souches sauvage et mutantes.

3-1 *Taf 14* est important pour la transcription de l'ARNm de IMP2

Les expériences d'essai en spot que nous avons effectué ont montré que Taf14 est probablement le facteur de transcription d'IMP2. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons quantifié l'expression de l'ARNm d'IMP2 par analyse de type Northern. La figure 13 montre les résultats obtenus.

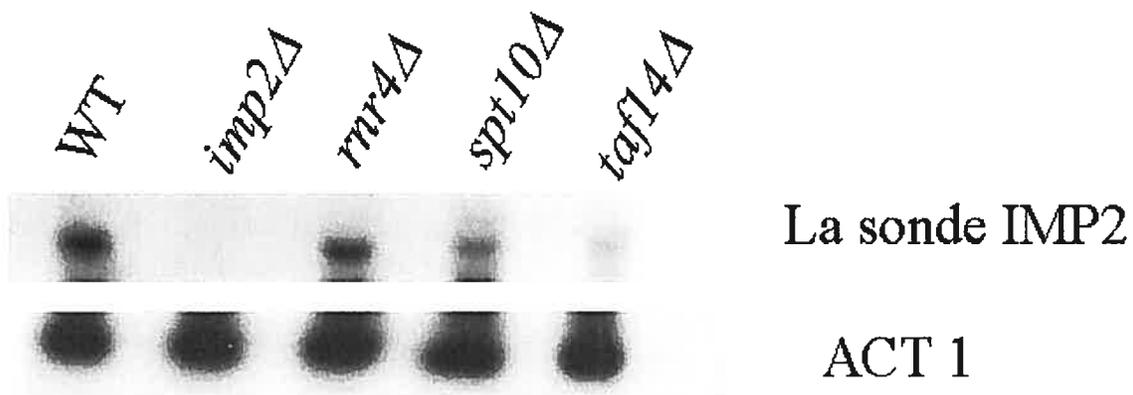


Figure 13 : analyse de type Northern de la souche sauvage (wt) et des souches mutantes *imp2Δ* (contrôle négatif), *rnr4Δ*, *spt10Δ* et *taf14Δ* avec la sonde JYM15.

La quantité de l'ARNm d'*IMP2* exprimé au niveau de la souche mutante *taf14Δ* est extrêmement faible par rapport à celle de la souche sauvage. **Donc Taf14 est important pour la transcription de l'ARNm d'*IMP2*.**

Nous pouvons remarquer que la souche *rnr4Δ* qui a eu un niveau d'expression de β -galactosidase très bas, présente une forte expression de l'ARNm d'*IMP2*. Ce paradoxe peut être expliqué en supposant qu'il y a probablement une perturbation de l'expression du gène rapporteur au niveau de l'expression de la protéine. Les mutants *rnr4Δ*, *spt10Δ* et *snf6Δ* présentent une forte expression de l'ARNm d'*IMP2* (résultats non montrés).

3-2 *Taf14* est important pour une forte expression de la protéine de fusion *Myc-Imp2*

Après la quantification de l'expression de l'ARNm d'*IMP2* dans la souche sauvage et les souches mutantes, nous avons quantifié l'expression de la protéine de fusion Imp2-myc dans les souches sauvage et *taf14Δ*.

Puisqu'il n'y a pas d'anticorps anti-Imp2 disponibles sur le marché, nous avons construit un tag MYC à l'extrémité C-terminale d'*IMP2*. L'intégration de *IMP2-MYC* a été vérifiée par PCR avec des amorces appropriées (voir Matériel et Méthodes). Pour quantifier l'expression de la protéine de fusion Myc-Imp2 par immunobuvardage, nous avons donc utilisé des anticorps anti-myc. La figure 14 montre les résultats obtenus.

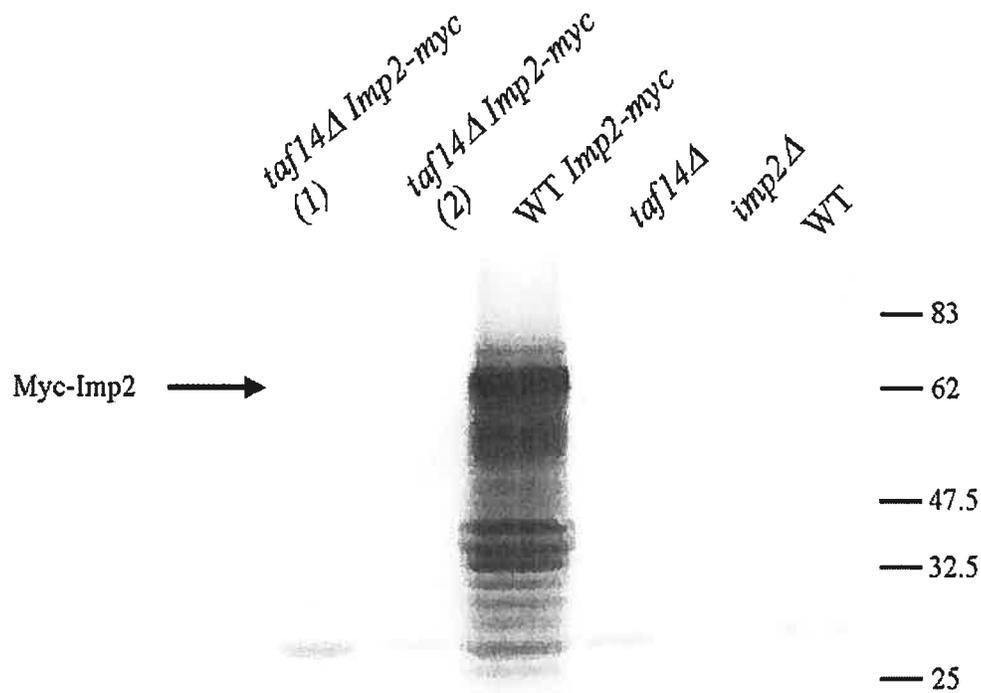


Figure 14 : Immunobuvardage avec des anticorps anti-myc, de la souche sauvage (wt), et la souche sauvage avec le tag Myc (WT *imp2-myc*), de la souche mutante *taf14Δ* avec le tag Myc (deux contrôles *taf14Δ imp2-myc* (1) et *taf14Δ imp2-myc* (2)), et des mutantes *taf14Δ*, *imp2Δ* (control négatif).

Nous n'avons pas fait le control de quantité des protéines (actin), mais nous pouvons voir que les bandes non spécifique qui apparaissent sur le film ont presque le même signal dans toutes les échantillons. Nous distinguons clairement qu'en absence de Taf14 (les deux souches mutantes *taf14Δ* avec le tag Myc, *taf14Δ Imp2-myc* (1) et *taf14Δ Imp2-myc* (2)), il n'y a pas d'expression de la protéine de fusion Imp2-Myc.

Par contre, la souche sauvage wt-*Imp2-myc*, présente une forte expression de la protéine de fusion *Imp2-myc*, donc Taf 14 est indispensable pour l'expression de la protéine *Imp2*.

La petite quantité d'ARNm d'*IMP2*, que nous avons obtenu par l'analyse de type Northern, est très faible pour être détectée par l'immunobuvardage.

4. La transformation de la souche *Taf14Δ* par un plasmide *pGFP-IMP2* la rend plus résistante à la BLM

Pour étudier l'effet de l'expression d'*IMP2* dans la souche *taf14Δ*, nous avons transformé cette souche avec le plasmide *pGFP-IMP2*.

pGFP-IMP2 est sous le contrôle du promoteur GAL inductible par le galactose (0.5%). Après la transformation, la sensibilité à la BLM a été détectée par l'expérience de courbe de survie. La figure 15 montre les résultats obtenus.

La souche *taf14Δ* est devenue plus résistante après la transformation par le plasmide *pGFP-IMP2*, indiquant que la sensibilité à la BLM de la souche *taf14Δ* survient suite à un manque d'expression d'*IMP2* dû à l'absence de l'activateur de transcription d'*IMP2*. Après transformation avec un plasmide qui exprime *IMP2* sous le contrôle d'un promoteur Gal, la souche *taf14Δ* devient plus résistante à la BLM. Donc nous avons une complémentation du phénotype d'*Imp2*.

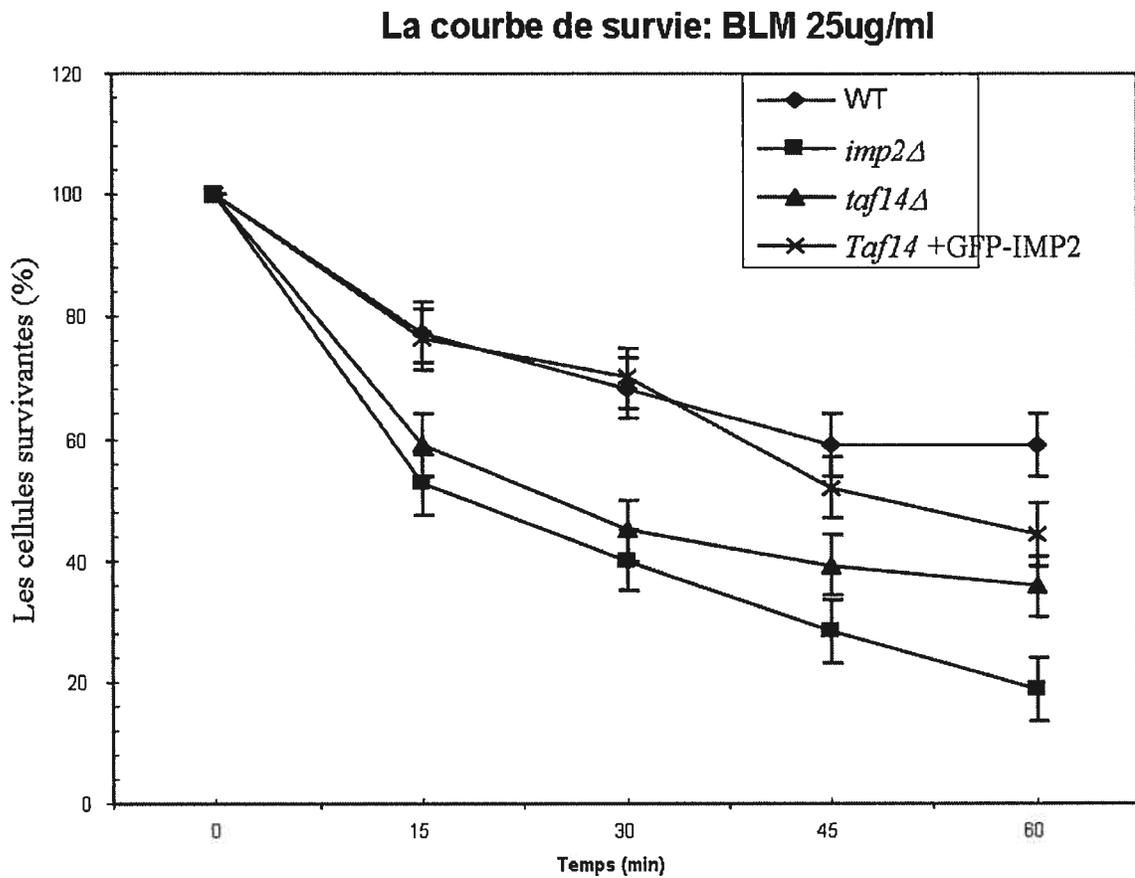


Figure 15 : Courbe de survie montrant le pourcentage des cellules survivantes après un traitement par 25 μ g/ml de la BLM pendant 15 min, 30 min, 45 min et 60 min. (n=7 et $\sigma \pm 4\%$)

5. Restauration de tous les phénotypes liés à IMP2 après la complémentation par un plasmide pGst-Taf14 de la souche taf14Δ

Après la transformation de la souche *taf14Δ* par un plasmide *pGst-Taf14*, nous avons étudié la sensibilité vis-à-vis de la BLM, du NaCl, du CaCl₂ et d'un pH basique (tous les phénotypes liés au *IMP2*).

5-1 La sensibilité à la BLM

Pour voir l'effet de Taf14 sur la sensibilité à la BLM de la souche *taf14Δ*, nous avons fait l'expérience d'essai en spot, la figure 16 montre les résultats obtenus.

Donc après la transformation par le plasmide *pGst-Tsf14* de la souche *taf14Δ*, celle-ci devient plus résistante. Cette résistante est dûe à l'expression de Taf14 qui peut probablement activer l'expression d'*IMP2*.

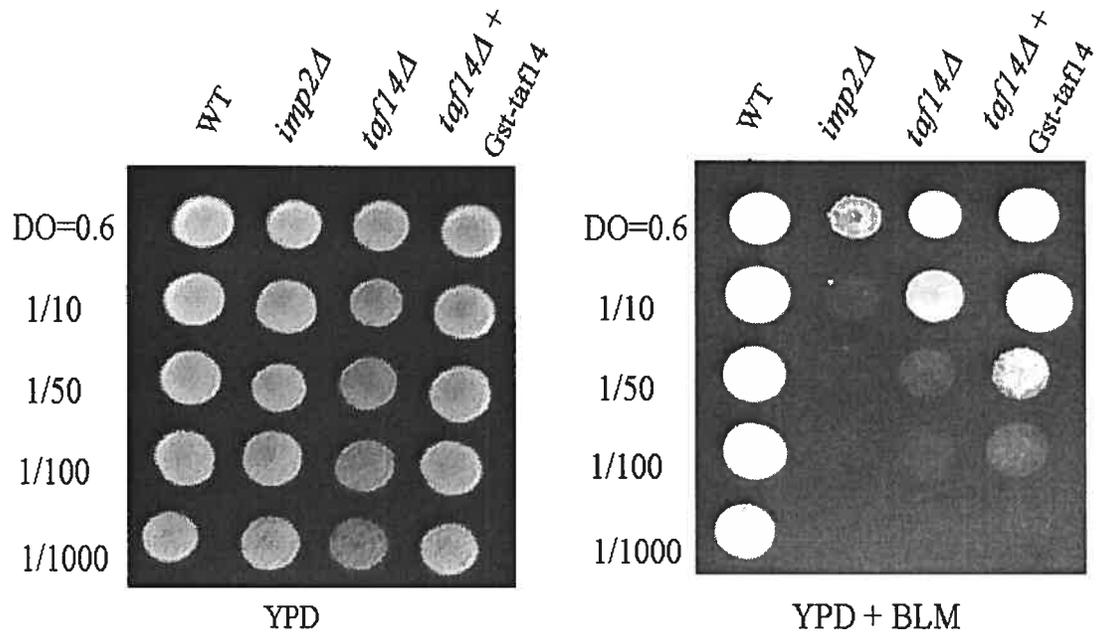


Figure 16 : Essai en spot mesurant la sensibilité à la BLM (2.5 $\mu\text{g/ml}$) de la souche sauvage (wt) et les souches mutantes *imp2Δ*, *taf14Δ* et *taf14Δ + pGst-Taf14*. La souche *taf14Δ + pGst-Taf14* devient plus résistante à la BLM par rapport à la mutante *taf14Δ*.

5-2 La sensibilité au NaCl

Nous avons mesuré également la sensibilité au NaCl après la transformation par un plasmide *pGst-Taf14* de la souche *taf14Δ*. La figure 17 montre les résultats obtenus.

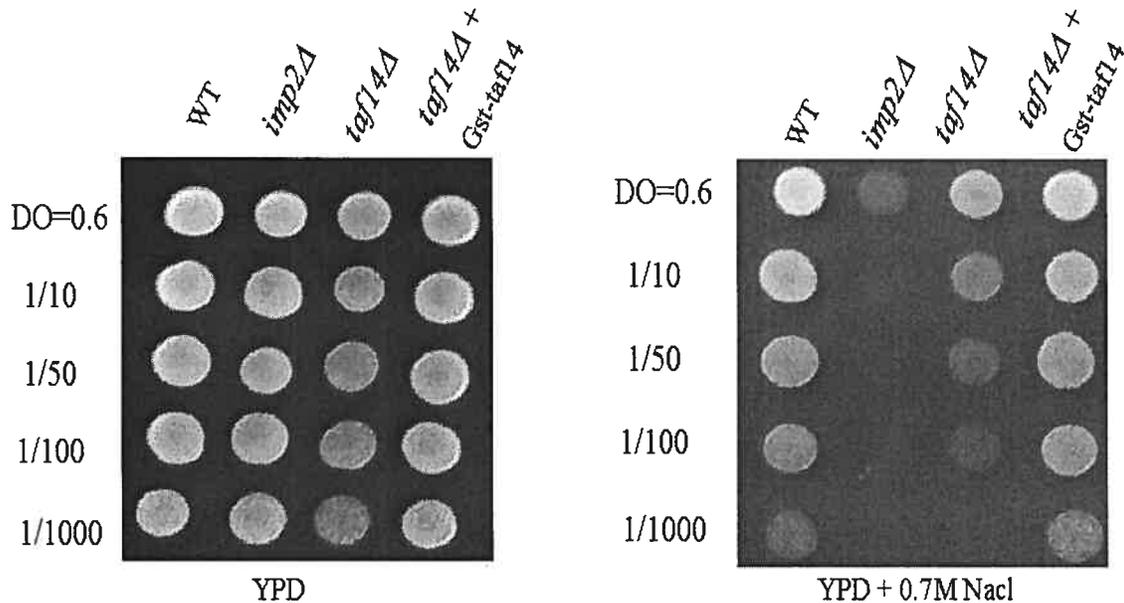


Figure 17 : Essai en spot mesurant la sensibilité au NaCl (0.7M) de la souche sauvage (wt) et les souches mutantes *imp2Δ*, *taf14Δ* et *taf14Δ + pGst-Taf14*. La souche *taf14Δ + pGst-Taf14* devient plus résistante au NaCl par rapport à la mutante *taf14Δ*.

L'expression de *TAF14* a permis une restauration totale du phénotype de résistante au NaCl. La souche *taf14Δ + Gst-Taf14* a le même phénotype que la souche sauvage (wt). Donc *Taf14* probablement active la transcription d'*IMP2* qui donne la résistante au NaCl.

5-3 La sensibilité au stress osmotique

Toujours en mesurant la sensibilité à différents stress lié au gène *IMP2*, nous avons étudié la sensibilité au stress osmotique après la transformation par le plasmide *pGst-Tsf14*. La figure 18 montre les résultats obtenus.

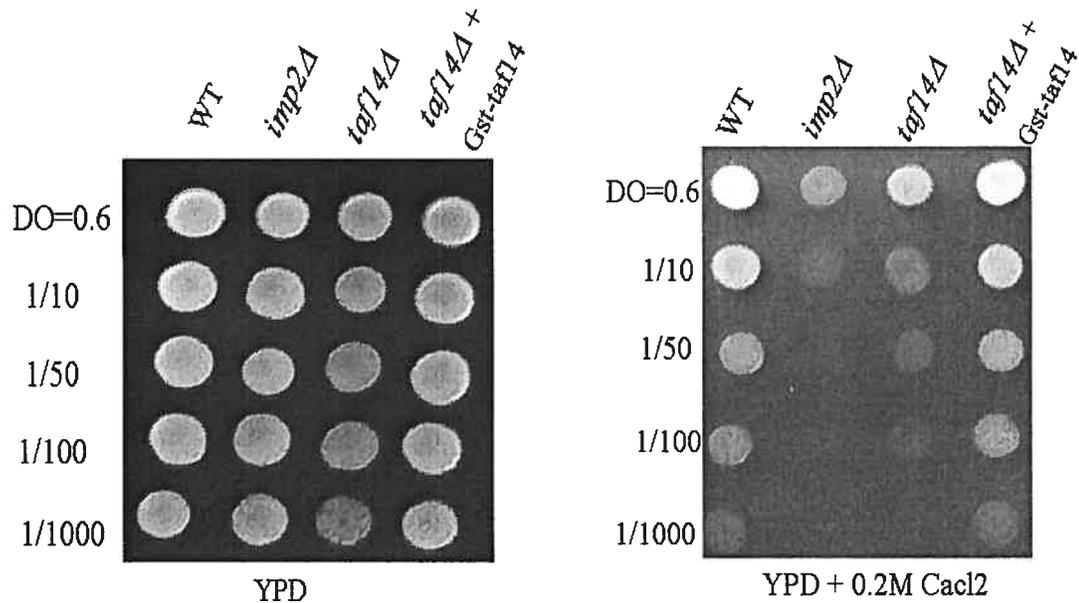


Figure 18 : Essai en spot mesurant la sensibilité au stress osmotique (0.2M de CaCl_2) de la souche sauvage (wt) et les souches mutantes *imp2Δ*, *taf14Δ* et *taf14Δ + pGst-Taf14*. La souche *taf14Δ + pGst-Taf14* devient plus résistante au stress osmotique par rapport au mutante *taf14Δ*.

Le plasmide *pGst-Tsf14* a rendu la souche *taf14Δ* plus résistante au stress osmotique causé par le CaCl_2 par rapport à la souche mutante *taf14Δ*. Il y a une complémentation parfaite de ce phénotype après la transformation par le plasmide *pGst-Taf14*. Donc ce résultat confirme le fait que *Taf14* active potentiellement la transcription d'*IMP2*.

5-4 La sensibilité au pH basique

La souche *taf14* Δ étant sensible au pH basique, nous avons étudié la sensibilité au pH basique de la souche *taf14* Δ après la transformation par le plasmide *pGst-Tsf14*. La figure 19 montre les résultats obtenus.

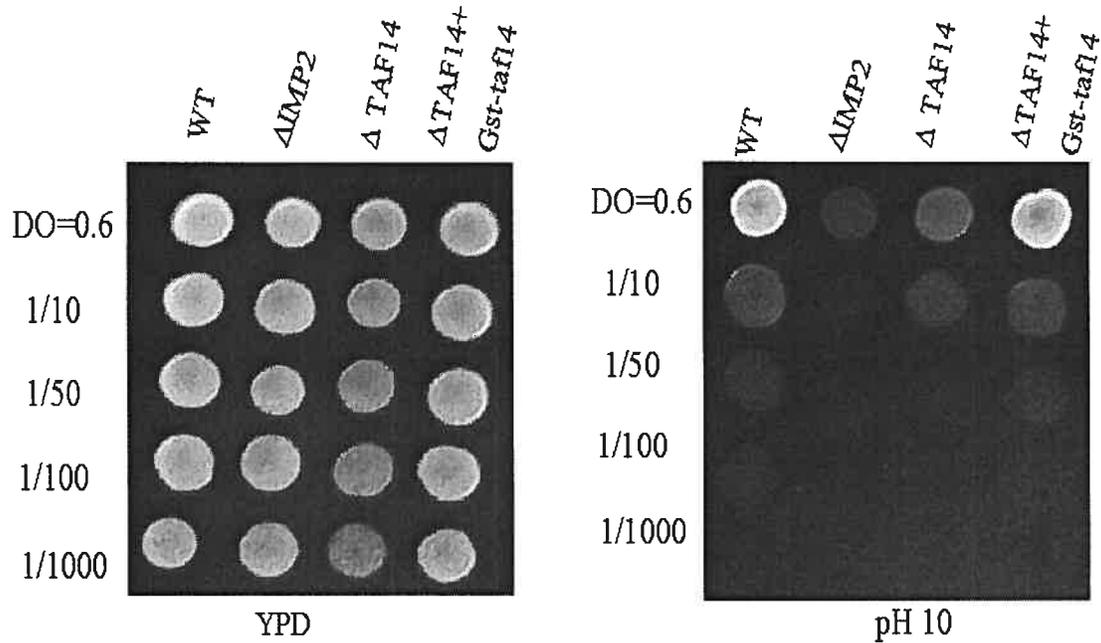


Figure 19 : Essai en spot mesurant la sensibilité au pH basique (pH10) de la souche sauvage (wt) et les souches mutantes *imp2* Δ et *taf14* Δ et *taf14* $\Delta+$ *pGst-Taf14*. La souche *taf14* $\Delta+$ *pGst-Taf14* devient plus résistante au pH basique par rapport à la mutante *taf14* Δ .

La souche *taf14* $\Delta+$ *Gst-Tsf14* est devenue plus résistante au pH basique par rapport à la souche mutante *taf14* Δ , et d'ailleurs elle retrouve le même phénotype que la souche sauvage wt. Donc Taf14 est responsable de la résistance au pH basique en activant probablement la transcription d'*IMP2* qui est impliqué directement dans cette résistance.

5-5 La restauration des phénotypes liés au gène IMP2 est dû à une expression de la protéine de fusion Gst-Taf14

5-6

Pour savoir si la résistance aux différents stress des souches *taf14Δ+pGst-Taf14* est due au Taf14, nous avons vérifié l'expression de la protéine de fusion Gst-Taf14 dans les souches *taf14Δ+pGst-Taf14* par immunobuvardage. Le gène *GST-TAF14* étant sous le contrôle de promoteur CUP induit par le cuivre, nous avons testé différentes concentrations de cuivre. La figure 20 montre les résultats obtenus.

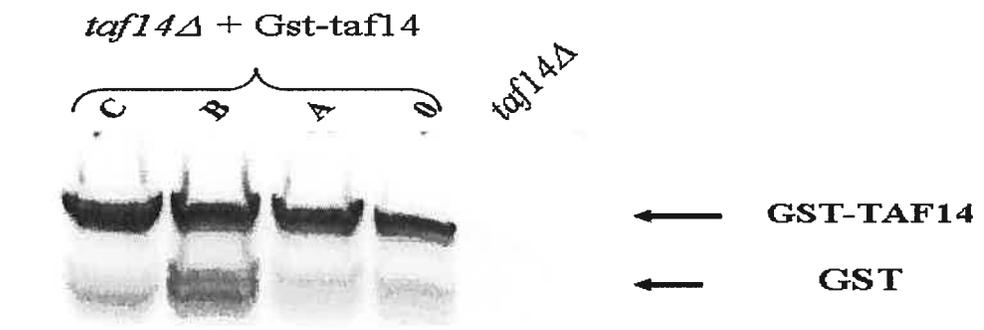


Figure 20 : Immunobuvardage avec des anticorps anti-GST montrant l'expression de la protéine de fusion Gst-Taf14 uniquement dans la souche mutante *taf14Δ-GST-TAF14* à différentes concentrations de cuivre

0 : sans induction

A : induction avec 0.1 mM de Cuivre

B : induction avec 0.5 mM de Cuivre

C : induction avec 1.0 mM de Cuivre

La mutante *taf14Δ* est un contrôle négatif.

Nous avons une expression de la protéine de fusion Gst-Taf14 dans la souche *taf14Δ-GST-TAF14* même en absence d'induction par le cuivre. Donc la restauration de tous les phénotypes associés à l'absence d'Imp2 chez la souche *taf14Δ* est due à une expression de la protéine de fusion Gst-Taf14 qui va probablement activer l'expression d'*IMP2*.

6. Taf14 ne se fixe pas sur la région IPE et ne semble pas jouer un rôle dans la fixation de l'appareil de transcription de base

Jusqu'à maintenant nous avons trouvé que Taf14 est probablement impliqué dans l'activation de la transcription d'*IMP2*. Il est indispensable pour la résistance aux différents stress liés à l'*imp2* probablement par l'activation de l'expression d'*IMP2*. Cependant nous ne savons pas comment Taf14 active l'expression d'*IMP2*. Pour étudier ce point, nous avons réalisé des expériences de retardement sur gel pour voir où Taf14 interagit avec le promoteur d'*IMP2* (IPE).

6-1 La purification de la protéine de fusion Gst-Taf14 par chromatographie sur colonne

Par chromatographie d'affinité sur colonne avec des billes anti-GST, nous avons purifié la protéine de fusion Gst-Taf14. La figure 21 montre un gel de polyacrylamide avec les différentes fractions (élution) de la protéine de fusion Gst-Taf14, après révélation des protéines par la technique de nitrate d'argent.

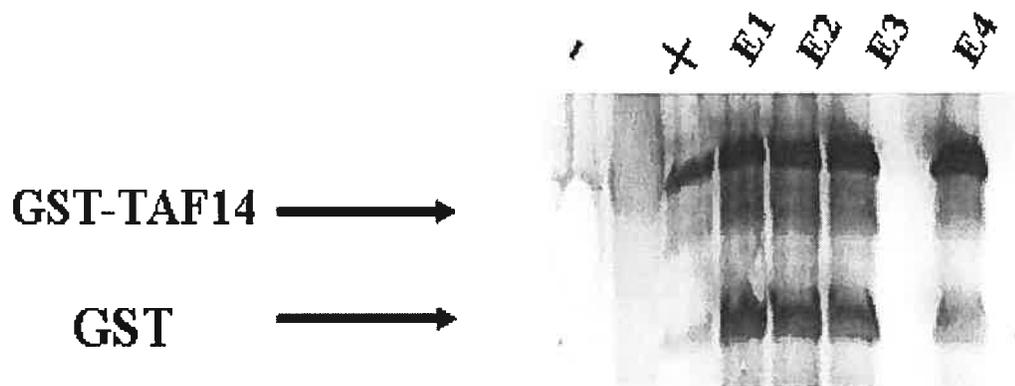


Figure 21 : Un gel de polyacrylamide. Après la chromatographie sur colonne pour purifier la protéines de fusion Gst-Taf14. Les protéines obtenues dans chaque élution sont visualisées par la technique de nitrate d'argent, nous pouvons remarquer des bandes très claires, l'une correspondant à la protéine Gst-Taf14 et l'autre à la protéine Gst dégradée.

6-2 La protéine de fusion Gst-Taf14 ne se fixe pas sur le promoteur d'IMP2

Une fois la protéine de fusion purifiée, nous avons fait l'expérience de retardement sur gel pour savoir si Taf14 se fixe sur la région promotrice IPE d'IMP2. La figure 22 montre les résultats obtenus.

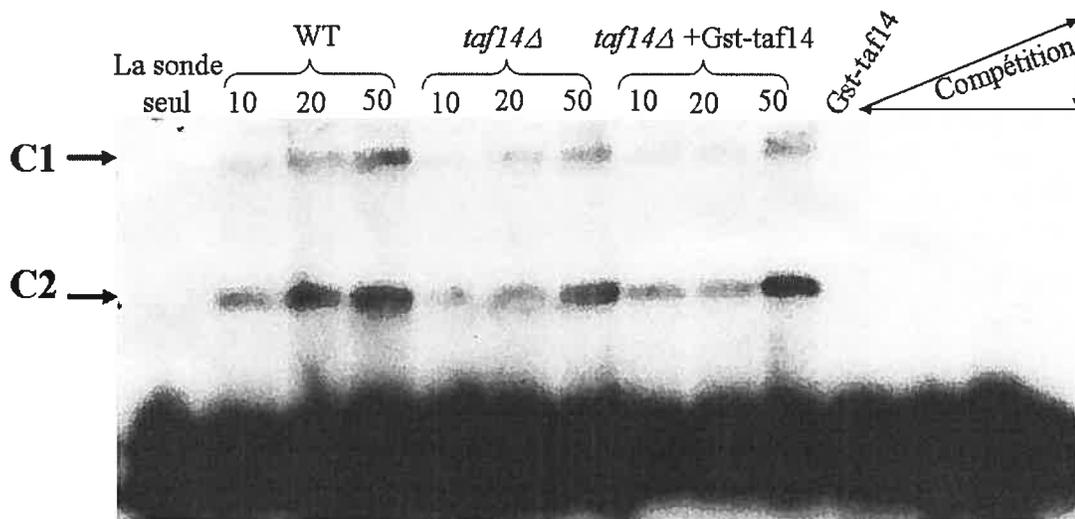


Figure 22: Retardement sur gel, nous avons utilisé comme sonde la région promotrice IPE d'*IMP2*. Trois quantités différentes d'extraits protéiques (10, 20 et 50 μ g) ont été utilisées de la souche sauvage (wt) et les deux souches mutantes *taf14* Δ et *taf14* Δ -pGST-TAF14. Un contrôle de spécificité (compétition) a été réalisé à une concentration croissante de la sonde froide IPE. C1 et C2 sont deux complexes protéiques (non identifiés) qui se fixent spécifiquement sur la région IPE.

Il y a deux complexes protéiques, C1 et C2, qui se fixent spécifiquement sur la région IPE, mais la protéine de fusion Gst-Taf14 ne se fixe pas sur la région promotrice d'*IMP2*.

Taf14 ne semble pas jouer de rôle dans la fixation des complexes protéiques C1 et C2 sur la région promotrice IPE, car les résultats de retardement sur gel ne montrent aucune différence entre la souche sauvage wt et la souche mutante *taf14* Δ .

7. *Le site d'initiation de la transcription d'IMP2*

Pour compléter notre étude sur la transcription d'*IMP2*, il fallait déterminer le point de démarrage de la transcription. Pour cela, nous avons utilisé la technique dite : extension par des amorces (primer extension). La figure 23 montre les résultats obtenus.

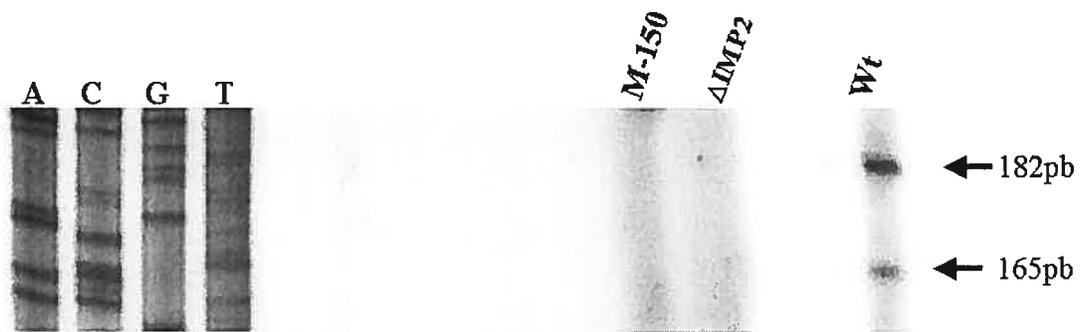


Figure 23: Extension par des amorces du gène *IMP2* chez deux souches wt et *imp2Δ*, avec un séquençage de la région promotrice d'*IMP2*. M150 est un marqueur de taille de 150 bases d'ADN (n'est pas présent sur la figure).

Nous distinguons deux bandes sur le gel, l'une de 182 pb et l'autre de 165 pb, donc il y a deux sites d'initiation de la transcription d'*IMP2*.

Dans la figure 24, nous pouvons voir la séquence d'*IMP2* avec les deux sites d'initiation de la transcription et la région IPE. Le premier nucléotide d'initiation de la transcription est un T (thymine), l'autre est un C (cytosine).

801 CCAATCTACA CGATCCAGAG ACATTTCTTT GCTCGTTTAA TGCTTGTTCA
851 TATGTGCGTT CTTTTGCACT TTGCACTTTC TTCCTATTTT ATCTTTTAA
901 GAAAGCTTTA AAGGTCCGGA AAAAAGGCTT GATCAAACAC AAGAGACTAT
951 GGAAAGGGTG AGTACCAAAA GAACCAACAA GAGAAACAAC CAAGTACGCA
1001 ATGCAGAAGA GCATATTGC TGACTION CCT GACGGAACAC AATCGAATCT
1051 ACACAGCATC AAAACGGAAA CGCCCACCAC GGTGGAGTTC GACTCGGAGC
1101 AGATGGAAAG GGGCCACAGG GAAAGAGGTC GTAGCAAGAA GAAAAGAGGC

Figure 24: La carte de la région promotrice d'*IMP2*. On voit les deux sites d'initiation de la transcription et le premier ATG.

L'analyse de la séquence d'*IMP2* avec les deux sites d'initiation de la transcription a révélé qu'*IMP2* ne possède pas de boîte TATA. Donc *IMP2* est un gène dépourvu de boîte TATA et qui contient deux sites d'initiation de la transcription.

VI- Discussion

Chez la levure, Imp2 est un activateur de transcription qui joue un rôle très important. Il active l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse et la régulation du stress oxydant causé par la BLM, le NaCl, le stress osmotique et thermique ainsi que le métabolisme du maltose, du raffinose et du galactose (Masson et Ramotar, 1996), (Donnini *et al*, 1992).

IPE (IMP2 Promoter Element) est une région indispensable pour la transcription du gène IMP2. Comme il a été suggéré, cette région promotrice (TGACTAA) est reconnue par les facteurs de transcription YAP à doigt de zinc. Cependant aucun des huit YAP de la levure ne semble jouer de rôle dans l'activation de la transcription d'IMP2 (données non publiées). Donc il doit y avoir un autre activateur de transcription qui reconnaît la région IPE, et active la transcription d'IMP2. Ce facteur de transcription spécifique d'IMP2, IPF (IMP2 Promotor Factor) peut probablement être un membre non encore identifié de la famille YAP.

Nos résultats montrent que Taf14 est probablement impliqué dans l'activation de la transcription d'IMP2. Il est important pour la transcription de l'ARNm d'IMP2, pour l'expression de la protéine imp2 et pour la restauration de tous les phénotypes associés à l'Imp2 chez la souche *taf14Δ*.

Cependant Taf14 ne se fixe pas sur la région IPE, et ne joue aucun rôle dans la fixation des facteurs de transcription sur cette région (les complexes protéiques C1 et C2, figure 14 des Résultats).

Chez la levure, Taf14 est une sous-unité faisant partie de plusieurs complexes de transcription tels que; TFIID, SAGA et TFIIF (Henry *et al*, 1994).

Aucune étude n'a montré que Taf14 est un facteur de transcription qui se fixe sur l'ADN, mais plutôt un cofacteur de transcription qui stabilise les autres sous unités Tafs, et qui joue le rôle de pont entre les complexes TFIID, TFIIF (Henry *et al*, 1994).

Taf14 est aussi une sous-unité du complexe SWI/SNF (Cairns *et al*, 1996) qui joue un rôle dans le remodelage de la chromatine et favorise ainsi l'activation de l'expression des gènes.

1. Comment Taf14 active la transcription d'IMP2

D'après nos résultats Taf14 est impliqué probablement dans l'activation de la transcription d'*IMP2* sans qu'il interagisse avec le promoteur d'*IMP2*. Pour cela, nous pouvons proposer deux modèles de mécanismes d'actions de Taf14 pour activer la transcription d'*IMP2* :

Modèle 1

Taf14 active la transcription d'*IMP2* par des interactions protéine-protéine permettant ainsi la connection entre les différents facteurs de transcription (figure 25).

Modèle 2

Taf14 active l'expression d'un autre facteur de transcription d'*IMP2*, inconnu (ITF pour *IMP2* Transcription Factor) qui va activer la transcription d'*IMP2* par des interactions protéines-protéines. Par conséquent, Taf14 sera un activateur indirect de la transcription d'*IMP2* (figure 26).

1 –1 Transcription directe d'IMP2 par Taf14

Selon ce modèle, (figure 25) Taf14 ne joue aucun rôle dans la fixation du complexe de la transcription de base. Cependant, en absence de Taf14, la transcription du gène *IMP2* est très faible. La présence de Taf14 permet une interaction entre les différents complexes protéiques de la machinerie de la transcription. Ceci favorise l'initiation et l'élongation de la transcription de l'ARNm d'*IMP2*.

L'interaction protéine-protéine menée par Taf14, peut favoriser le recrutement des autres facteurs de transcription essentiels pour l'activation de la transcription d'*IMP2*. Ce qui pourrait favoriser la stabilité de l'appareil de la transcription de base, probablement par des modifications post-traductionnelles de certaines sous-unités des complexes, favorisant ainsi l'élongation de la transcription d'*IMP2*.

Chez la levure, l'activation et la régulation de la transcription dans les conditions de stress, mettent en jeu un mécanisme similaire à ce modèle proposé. En effet, les protéines du choc thermique agissent en tant que chaperons moléculaires impliqués dans le processus de remaniement correct et dans la protection contre les dégradations et l'agrégation des protéines (Trott, A. and Morano, K.A. 2003).

Un changement de la structure de la chromatine pour favoriser la transcription des gènes est une autre possibilité pour expliquer le rôle de TAF14 dans la transcription directe d'*IMP2*. Taf14 pourrait effectuer cet effet via sa présence dans le complexe SWI/SNF.

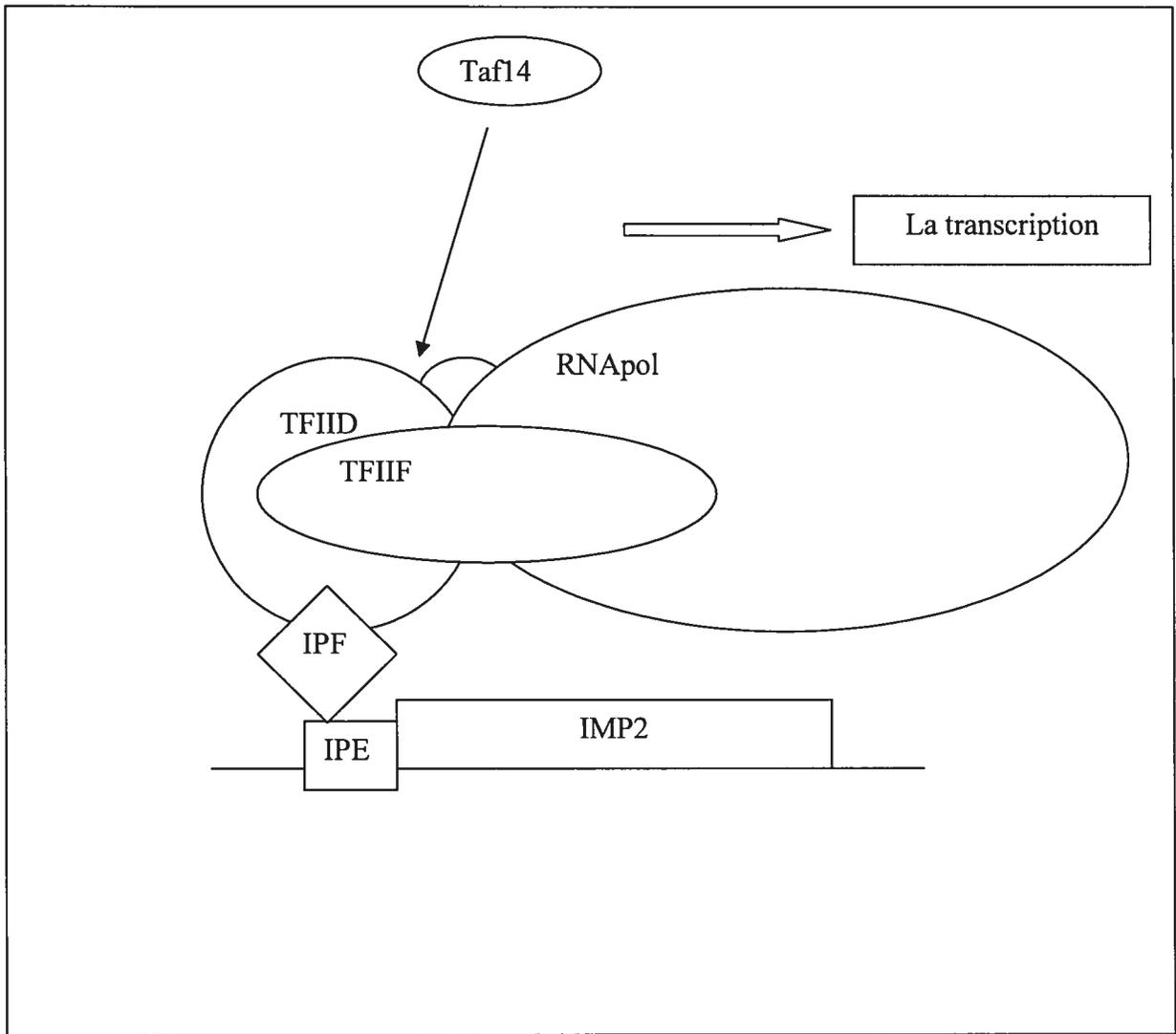


Figure 25 : Taf14 active les interactions protéine-protéine entre les différents complexes de la transcription d'*IMP2* fixé sur IPE.

1-2 Transcription Indirecte d'IMP2 par Taf14

Selon ce modèle, Taf14 active l'expression d'un autre facteur de transcription d'*IMP2* (ITF pour *IMP2* Transcription Factor) qui va activer la transcription d'*IMP2* par des interactions protéines-protéines. Par conséquent, Taf14 sera un activateur indirect de la transcription d'*IMP2* (figure 26). Cependant nous ne pouvons pas supposer que Taf14 active la transcription de IPF (*IMP2* Promotor Factor), car dans la souche mutante *taf14Δ* et la souche sauvage (WT), les deux complexes protéiques (C1 et C2, figure 22) ne montrent pas de différence de fixation sur IPE.

Dans ce modèle, Taf14 est impliqué dans l'activation d'ITF qui va activer à son tour la transcription d'*IMP2* par des interactions protéine-protéine comme dans le cas du modèle précédent (modèle 1). ITF favorise l'expression d'*IMP2*, soit par une modification post-traductionnelle des protéines de l'un des complexes de la transcription de base d'*IMP2*, soit par le recrutement d'un autre facteur de transcription spécifique. Par ailleurs, ITF peut jouer directement un rôle dans le processus de l'élongation de la transcription d'*IMP2*.

Ce modèle que nous proposons serait analogue au modèle type de la régulation de transcription par chaîne de cascade. Par exemple, dans le cas du système de la voie de HOG chez la levure, les conditions de stress osmotique permettent l'activation du gène YAP4 par activation d'une série de gènes en amont (Hog1p et Msn2p) avant d'activer lui-même plusieurs autres gènes tels que GCY1, DCS2 et GPP2 (Fernandes *et al*, 1997).

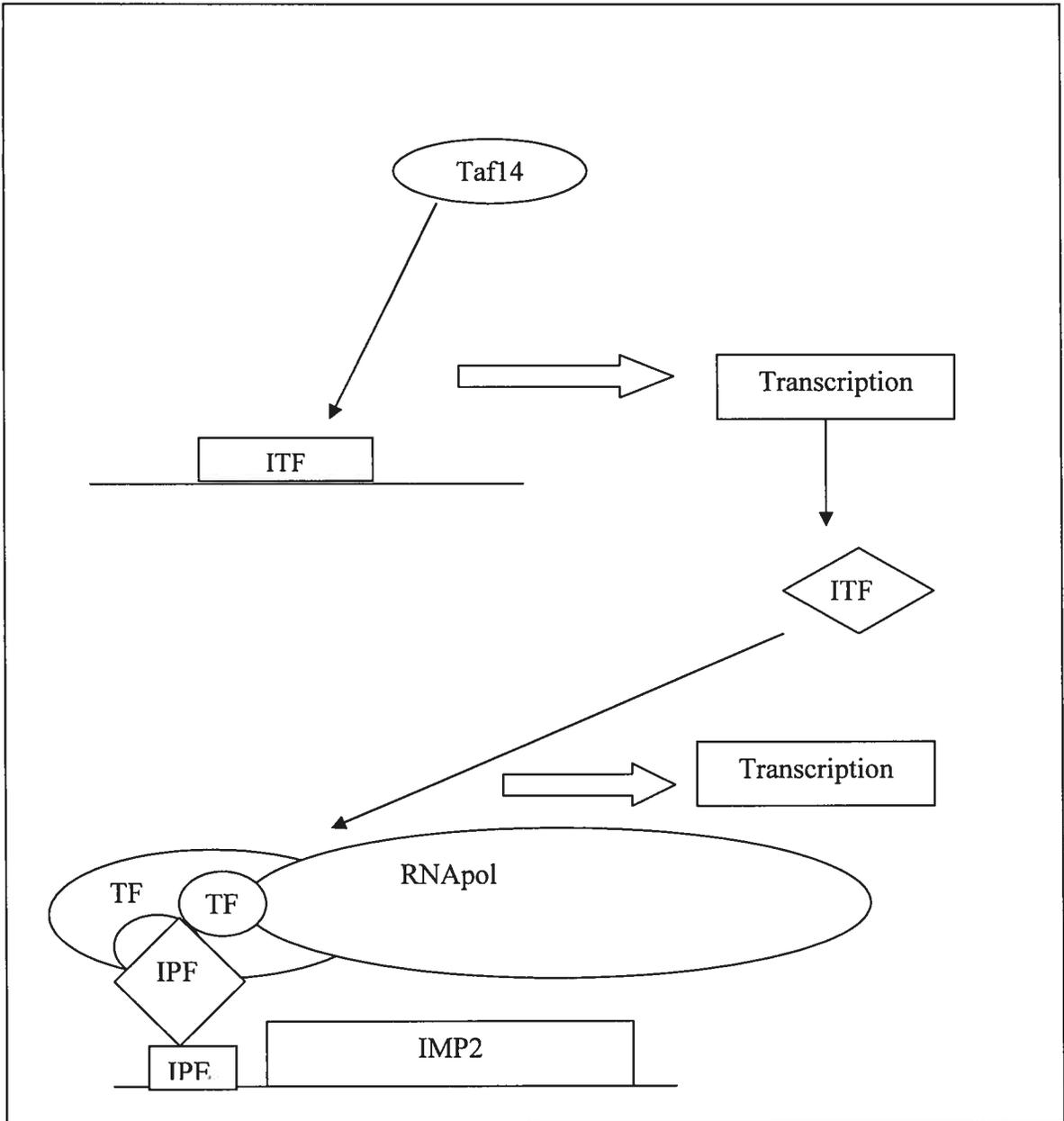


Figure 26 : Taf14 active la transcription d'ITF (IMP2 Transcription Factor) qui va se fixer sur l'appareil de la transcription de base et active à son tour l'expression d'IMP2

Dans les deux cas de figures, d'autres expériences sont nécessaires pour trancher entre les deux modèles proposés. Si dans le cas d'absence d'une interaction directe entre Taf14 et les motifs régulateurs d'IPE, nous proposons le type d'expériences de criblage par double-Hybride pour déterminer le ou les molécules putatives pouvant faire partie du complexe de transcription d'*IMP2*. En outre, l'analyse de la variation de l'expression génétique entre la souche sauvage et le mutant *taf14Δ* utilisant les puces à ADN (DNA-microarrays) serait d'une grande importance dans notre étude.

2. De la levure à l'homme

Chez la levure, Imp2 est un activateur de transcription qui joue un rôle très important dans les conditions de stress. Chez l'homme, il n'existe pas d'homologue structurel d'Imp2. Cependant, en regardant le rôle important d'Imp2 dans le bon fonctionnement de la cellule et particulièrement dans les conditions de stress, nous pouvons supposer l'existence d'un homologue fonctionnel d'Imp2 chez l'homme qui joue le même rôle de défense contre le stress.

Dans ce travail, nous avons montré que Taf14 est important dans l'activation de l'expression d'*IMP2*. Par conséquent, Taf14 est aussi important comme régulateur de la transcription impliqué dans l'adaptation de la cellule contre le stress. Taf14 est une protéine très conservée nous la trouvons chez la levure et chez l'homme, ceci signifie son importance dans le bon déroulement des processus biologiques et surtout dans la transcription des gènes.

Il a été rapporté chez l'homme l'existence de deux homologues structuraux de Taf14 qui sont des activateurs de transcription appelé ENL (Tkachuk *et al* 1992) et AF9 (Nakamura *et al*, 1993). La translocation chromosomique réciproque des gènes ENL et AF9 est associée à la leucémie aiguë (Nakamura *et al*, 1993), donc ces deux gènes sont impliqués dans l'activation de la transcription d'autres gènes importants, permettant une résistance au stress et la stabilité génomique. Toute perturbation dans l'un de ces gènes peut entraîner des conséquences graves dans la cellule et par conséquent, l'organisme entier (leucémie).

Si nous tenons compte du niveau de conservation de la fonction de Taf14 de la levure à l'homme, nous pouvons dire que parmi les gènes activables par AP9/ENL, et qui sont liés aux réponses de stress et leur rôles de maintien de la stabilité génomique, il existe probablement un homologue fonctionnel humain d'*IMP2* (*hIMP2*) (Figure 27).

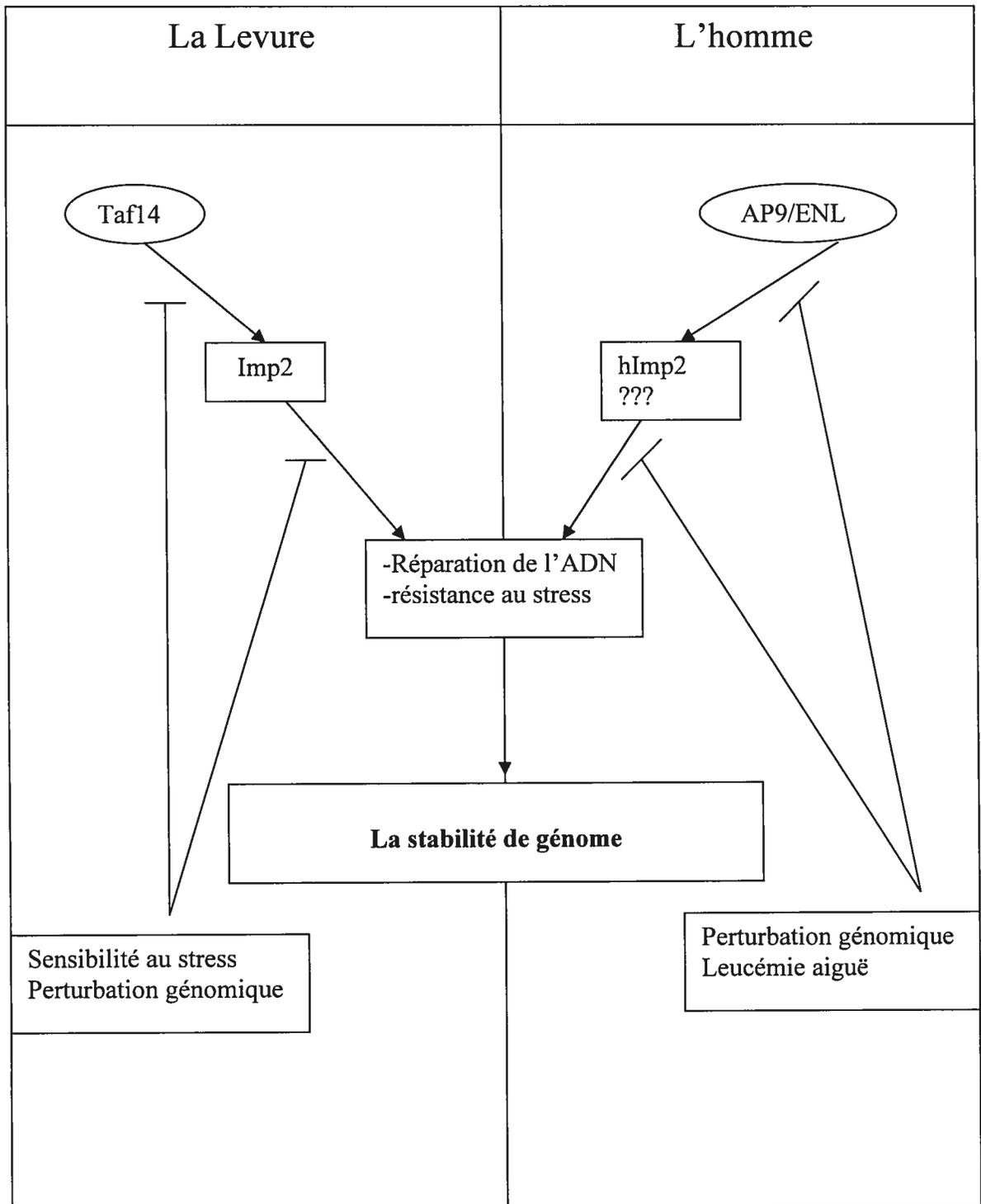


Figure 27: Schéma montrant les liens communs entre la levure et l'homme concernant les fonctions d'*IMP2* et de son activateur Taf14.

1. Conclusion

Dans notre projet nous avons montré que Taf14 est un cofacteur de transcription qui active probablement la transcription d'*IMP2*. Taf 14, qui est une sous-unité de deux complexes TFIID et TFIIF, active peut être la transcription de *IMP2* par des interactions protéine-protéine.

Une autre possibilité de la fonction de Taf14 dans la transcription d'*IMP2* est que Taf14 peut masquer les sites d'interaction de TFIID et TFIIF pour une régulation d'interaction entre ces deux complexes sans qu'elle ne joue aucun rôle dans la fixation des facteurs de transcription sur la région promotrice d'*IMP2*.

Nous ne connaissons toujours pas le IPF qui se fixe sur IPE pour activer directement l'expression d'*IMP2*. Pour trouver ce facteur nous devons continuer à étudier les autres mutants sensibles à la BLM par la même stratégie que nous allons utiliser pour trouver Taf14.

Il reste encore beaucoup des mutants sensibles à la BLM (tableau III) qui ne sont pas encore étudiés. Nous devons commencer la quantification du niveau d'expression de β -gal sous le contrôle de IPE, suivi des tests de vérification de l'expression d'*IMP2*.

Les études de Taf14 ainsi que d'IPF vont nous permettre de comprendre le mécanisme de résistance à la BLM chez la levure, et de trouver ensuite l'homologue fonctionnel d'*IMP2* chez l'homme. Ceci va nous permettre de faire un traitement efficace lors de la chimiothérapie des cancers par la BLM. De plus, ces études vont

nous permettre de comprendre dans le futur le rôle d'ENL/AF9 dans la leucémie aiguë chez l'homme.

Bibliographie

- Adams AE, Pringle JR. Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 1984 Mar; 98(3):934-45.
- Adamson IYR, Bowden DH. The pathogenesis of bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* 1974; 77:185–191
- Alberti A, Lodi T, Ferrero I, Donnini C. MIG1-dependent and MIG1-independent regulation of GAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: role of Imp2p. *Yeast.* 2003 Oct 15; 20(13):1085-96.
- Aouida M, Page N, Leduc A, Peter M, Ramotar D. A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals altered transport as a mechanism of resistance to the anticancer drug bleomycin. *Cancer Res.* 2004 Feb 1;64(3):1102-9
- Apone LM, Virbasius CM, Reese JC, Green MR. Yeast TAF (II) 90 is required for cell-cycle progression through G2/M but not for general transcription activation. *Genes Dev.* 1996 Sep 15; 10(18):2368-80.
- Barnes G, Drubin DG, Stearns T. The cytoskeleton of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Cell Biol.* 1990 Feb; 2(1):109-15
- Bradbury J. Yeast genome sequenced completely *Lancet.* 1996, 27; 347(9009):1175.
- Brendan Bell, Tora L. Regulation of Gene Expression by Multiple Forms of TFIID and Other Novel TAF_{II}-Containing Complexes. *Exp Cell Res.* 1999 Jan 10; 246(1):11-9.

- Brou C, Chaudhary S, Davidson I, Lutz Y, Wu J, Egly JM, Tora L, Chambon P. Distinct TFIID complexes mediate the effect of different transcriptional activators. *EMBO J.* 1993 Feb;12(2):489-99
- Burley SK, Roeder RG. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem.* 1996; 65:769-99.
- Burke TW, Willy PJ, Kutach AK, Butler JE, Kadonaga JT. The DPE, a conserved downstream core promoter element that is functionally analogous to the TATA box. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1998; 63:75-82.
- Burke TW, Kadonaga JT. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev.* 1997 Nov 15;11(22):3020-31
- Chalkley GE, Verrijzer CP. DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *EMBO J.* 1999 Sep 1; 18(17):4835-45.
- Cairns BR, Henry NL, Kornberg RD. TFG/TAF30/ANC1, a component of the yeast SWI/SNF complex that is similar to the leukemogenic proteins ENL and AF9. *Mol Cell Biol.* 1996 Jul; 16(7):3308-16.
- Crooke ST, Comis RL, Einhorn LH, Strong JE, Broughton A, Prestayko AW. Effects of variations in renal function on the clinical pharmacology of bleomycin administered as an iv bolus. *Cancer Treat Rep* 1977; 61:1631-1636
- Dikstein R, Zhou S, Tjian R. Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII130. *Cell.* 1996 Oct 4; 87(1):137-46.
- Donnini C, Lodi T, Ferrero I, Puglisi PP. IMP2, a nuclear gene controlling the mitochondrial dependence of galactose, maltose and raffinose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1992 Feb; 8(2):83-93.
- Drubin DG. Development of cell polarity in budding yeast. *Cell.* 1991 Jun 28;65(7):1093-6
- Ellenberger TE, Brandl CJ, Struhl K, Harrison SC. The GCN4 basic-region-leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α -helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* 1992 Dec 24;71(7):1223-37
- Farr SB, Kogoma T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev* 1991 Dec;55(4):561-85

- Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol.* 1997 Dec; 17(12):6982-93.
- Gabrielsen OS, Sentenac A. RNA polymerase III and its transcription factors. *Trends biochem Sci*, 1991, 16:412-416
- Gangloff YG, Romier C, Thuault S, Werten S, Davidson I. The histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID. : *Trends Biochem Sci.* 2001 Apr; 26(4):250-7.
- Gangloff YG, Sanders SL, Romier C, Kirschner D, Weil PA, Tora L, Davidson I. Histone folds mediate selective heterodimerization of yeast TAF(II)25 with TFIID components yTAF(II)47 and yTAF(II)65 and with SAGA component ySPT7. *Mol Cell Biol.* 2001 Mar;21(5):1841-53.
- Garraway IP, Semple K, Smale ST. Transcription of the Lymphocyte-Specific Terminal Deoxynucleotidyltransferase Gene Requires a Specific Core Promoter Structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 April 30; 93(9): 4336–4341.
- Gershoni JM, Palade GE. Protein blotting: principles and applications. (1983). *Anal Biochem* 131,1-15
- Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. (1992) *Nucleic Acides Res* 20:1425
- Grant PA, Schieltz, D, Pray-Grant MG, Steger DJ, Reese JC, Yates, Workman. A subset of TAF (II) s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. 1998 *Cell* 94, 45–53.
- Grant CM, Collinson LP, Roe JH, Dawes IW. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target for yAP-1 transcriptional regulation. (1996) *Mol. Microbiol*, 21, 171–179.
- Grunstein M. Histone function in transcription. *Annu Rev Cell Biol.* 1990; 6:643-78.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. (1984) *Biochem. J.* 219, 1-14.

- Hannan KM, Hannan RD, Rothblum LI. Transcription by RNA polymerase I. *Front Biosci.* 1998 Mar 26; 3:376-98.
- Hansen SK, Takada S, Jacobson RH, Lis JT, Tjian R. Transcription properties of a cell type-specific TATA-binding protein, TRF. *Cell.* 1997 Oct 3; 91(1):71-83.
- Hengartner CJ, Thompson CM, Zhang J, Chao DM, Liao SM, Koleske AJ, Okamura S, Young RA. Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev.* 1995 Apr 15; 9(8):897-910.
- Henry NL, Campbell AM, Feaver WJ, Poon D, Weil PA, Kornberg RD. TFIIF-TAF-RNA polymerase II connection. *Genes Dev.* 1994 Dec 1;8(23):2868-78.
- Hirata D, Yano K, Miyakawa T. Stress-induced transcriptional activation mediated by YAP1 and YAP2 genes that encode the Jun family of transcriptional activators in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 242, 250-256(1994)
- Hoffman A, Sinn E, Yamamoto T, Wang J, Roy A, Horikoshi M, Roeder RG. Highly conserved core domain and unique N terminus with presumptive regulatory motifs in a human TATA factor (TFIID). *Nature.* 1990 Jul 26; 346(6282):387-90.
- Ito H, Fukuda Y, Muruta k, Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-8(1983).
- Jaehning JA, Chang M. A multiplicity of mediators: alternative forms of transcription complexes communicate with transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* 1997 Dec 15; 25(24):4861-5.
- Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998 14,1511-27
- Jules-Elysee K, White DA. Bleomycin-induced pulmonary toxicity. *Clin Chest Med* 1990; 11:1-20
- Karin M, Liu Z, Zandi E. AP1 function and regulation. *Curr.opin.cell.Bio*9,240-6 (1997)
- Kim, Y.J, Bjo rklund, S., Li, Y., Sayre, M.H., and Kornberg, R.D. 1994. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*77:599-608.

- Kudo N, Taoka H, Yoshida M, Horinouchi S. Identification of a novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in yeast AP-1-like transcription factor. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 886:204-7.
- Kuge S, Jones N, Nomoto A. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *The EMBO Journal* Vol. 16. 1710-1720,(1997)
- Kuge, S, Jones N. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J*, 13, 655-664(1994)
- Kuge S, Toda T, Iizuka N, Nomoto A. Crm1 (XpoI) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells* 3, 521–532 (1998)
- Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H, Reinberg D, Ebricht RH: New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev* 1998; 12:34-44.
- Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759–1764. (1988)
- Lavau C, Szilvassy SJ, Slany R, Cleary ML. Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL. *EMBO J.* 1997 Jul 16;16(14):4226-37
- Lazo JS, Sebt SM, Schellens JH. Bleomycin. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 16:39–47(1996)
- Lee TI, Causton HC, Holstege FC, Shen WC, Hannett N, Jennings EG, Winston F, Green MR, Young RA. Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature.* 2000 Jun 8; 405(6787):701-4.
- Lee TI, Young RA. Regulation of gene expression by TBP-associated proteins. *Genes Dev.* 1998 May 15;12(10):1398-408
- Lee TI, Young RA. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet.* 2000; 34:77-137.

- Leung MF, Sokoloski JA, Sartorelli AC. Changes in microtubules, microtubule-associated proteins, and intermediate filaments during the differentiation of HL-60 leukemia cells. *Cancer Res.* 1992 Feb 15; 52(4):949-54.
- Lodi T, Goffrini P, Ferrero I, Donnini C. IMP2, a gene involved in the expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 1995 Sep; 141 (Pt 9):2201-9.
- Lorch Y, Cairns BR, Zhang M, Kornberg RD. Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome. *Cell*, 10; 94(1):29-34. 1998
- Loregger T, Pollheimer J, Knofler M. Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast. *Placenta.* 2003 Apr; 24 Suppl A: S104-10.
- Luger K, Rechsteiner TJ, Flaus AJ, Waye MM, Richmond TJ. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol.* 1997 Sep 26; 272(3):301-11.
- Martinez E, Chiang CM, Ge H, Roeder RG. TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II promoter. *EMBO J.* 1994 Jul 1;13(13):3115-26
- Mary C. Thomas, Cheng-Ming Chiang. *The General Transcription Machinery and General Cofactors Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41:105–178, 2006
- Masson JY, Ramotar D. The transcriptional activator Imp2p maintains ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1998 Jun; 149(2):893-901.
- Masson JY, Ramotar D. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant defines a new locus essential for resistance to the antitumour drug bleomycin. *Can J Microbiol.* 1996 Aug; 42(8):835-43.
- Masson JY, Ramotar D. The *Saccharomyces cerevisiae* IMP2 gene encodes a transcriptional activator that mediates protection against DNA damage caused by bleomycin and other oxidants. *Mol Cell Biol.* 1996 May; 16(5):2091-100.
- Mathis DJ, Chambon P. The SV40 early region TATA box is required for accurate in vitro initiation of transcription. *Nature.* 1981 Mar 26; 290(5804):310-5.

- Miller DO, Yoe JH. Spectrophotometric determination of chromium in human plasma and red cells. *Clin Chim Acta*. 1959 May; 4(3):378-83.
- Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T, Nakatani Y, Allis CD. The TAF (II) 250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*. 1996 Dec 27; 87(7):1261-70.
- Moqtaderi Z, Bai Y, Poon D, Weil PA, Struhl K. TBP-associated factors are not generally required for transcriptional activation in yeast. *Nature* 383, pp. 188–191
- Moyer-Rowley WS, Harshman KD, Parker CS. Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator protein. *Genes Dev*, 3, 283-292 (1989)
- Nakamura T, Alder H, Gu Y, Prasad R, Canaani O, Kamada N, Gale RP, Lange B, Crist WM, Nowell PC. Genes on chromosomes 4, 9, and 19 involved in 11q23 abnormalities in acute leukemia share sequence homology and/or common motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 May 15; 90(10):4631
- Neely, K., Workman, J., 2002. The complexity of chromatin remodeling and its links to cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1603, 19– 29.
- Novick P, Botstein D. Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants. *Cell* 1985 Feb; 40(2):405-16.
- Nygard O, Holmberg L, Melander Y. Probing the conformational changes in 5.8S, 18S and 28S rRNA upon association of derived subunits into complete 80S ribosomes. *Nucleic Acids Res*. 1994 Jul 25; 22(14):2776-83.
- Ogryzko VV, Kotani T, Zhang X, Schiltz RL, Howard T, Yang XJ, Howard BH, Qin J, Nakatani Y. Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell*. 1998 Jul 10; 94(1):35-44.
- Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* (1996)10:2657-2683
- Oelgeschlager T, Tao Y, Kang YK, Roeder RG. Transcription activation via enhanced preinitiation complex assembly in a human cell-free system lacking TAFs. *Mol. Cell* 1, pp. 925–931.

- Ossipow, V, Tassan, J.-P, Nigg, E.A, and Schibler, U. 1995. A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation. *Cell* 83:137–146.
- Patikoglou G, Burley SK. Eukaryotic transcription factor-DNA complexes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1997; 26:289-325.
- Peterson CL, Dingwall A, Scott MP. Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc Natl Acad Sci.* 1994. 12; 91(8):2905-8.
- Povirk LF, Austin MJ. Genotoxicity of bleomycin. *Mutat Res* 257:127–143, (1991).
- Rauscher FJ, Voulalas PJ, Franza BR Jr, Curran T. Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes Dev.* 2, 1687–1699.
- Radicella JP, Dherin C, Desmaze C, Fox MS, Boiteux S. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci.* 1997 94,8010-5
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature.* 2000 Aug 10; 406(6796):593-9.
- Rout MP, Kilmartin JV. Components of the yeast spindle and spindle pole body. *J Cell Biol.* 1990 Nov; 111(5 Pt 1):1913-27.
- Sambrook J, Fritsh E, Maniatis T. *Molecular cloning-A laboratory manual.* C.S.H.L., ed. (1989)
- Sauer F, Tjian R. Mechanisms of transcriptional activation: differences and similarities between yeast, *Drosophila*, and man. *Curr. Opin. Genet. Dev.,* 7, 176–181. (1997).
- Shen WC, Green MR. Yeast TAF_{II}145 functions as a core promoter selectivity factor, not a general coactivator. *Cell* 90,615 -624. (1997).

- Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 18:3091-3092 (1990).
- Schnell N, Entian K.D. Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene (PAR1) conferring resistance to iron chelators. *Eur. J. Biochem.*, 200, 487-493. (1991).
- Smale ST, Baltimore D. The "initiator" as a transcription control element. *Cell*. 1989 Apr 7;57(1):103-13
- Smale ST, Jain A, Kaufmann J, Emami KH, Lo K, Garraway IP. The initiator element: a paradigm for core promoter heterogeneity within metazoan protein-coding genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1998; 63:21-31.
- Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev*. 1998 Mar 1; 12(5):599-606.
- Sauer F, Wassarman DA, Rubin GM, Tjian R. TAF(II)s mediate activation of transcription in the *Drosophila* embryo. *Cell*. 1996 Dec 27;87(7):1271-84
- Treich I, Cairns BR, de los Santos T, Brewster E, Carlson M. SNF11, a new component of the yeast SNF-SWI complex that interacts with a conserved region of SNF2. *Mol Cell Biol*. 1995 Aug; 15(8):4240-8.
- Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. Involvement of a homolog of *Drosophila* trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell*. 1992 13; 71(4):691-700.
- Tugores A, Magness ST, Brenner DA. A single promoter directs both housekeeping and erythroid preferential expression of the human ferrochelatase gene. *J Biol Chem*. 1994 Dec 9; 269(49):30789-97.
- Umezawa H, Takeuchi T, Hori S, Sawa T, Ishizuka M. Studies on the mechanism of antitumor effect of bleomycin in squamous cell carcinoma. *J Antibiot* 1972; 25:409-420
- Vasicek R, Meinhardt G, Haidweger E, Rotheneder H, Husslein P, Knofler M. Expression of the human Hand1 gene in trophoblastic cells is transcriptionally regulated by activating and repressing specificity protein (Sp)-elements. *Gene*. 2003 Jan 2; 302(1-2):115-27.

- Verrijzer CP, Chen JL, Yokomori K, Tjian R. Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. *Cell*. 1995 ; 81(7):1115-25
- Verrijzer CP, Tjian R. TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem Sci*. 1996 Sep; 21(9):338-42.
- Vijayalaxmi, Burkart W. Resistance and cross-resistance to chromosome damage in human blood lymphocytes adapted to bleomycin *Mutat Res* 211;1-51,1989
- Vinh DB, Welch MD, Corsi AK, Wertman KF, Drubin DG. Genetic evidence for functional interactions between actin noncomplementing (Anc) gene products and actin cytoskeletal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1993 Oct; 135(2):275-86.
- Walker SS, Reese JC, Apone LM, Green MR. Transcription activation in cells lacking TAFIIS. *Nature*. 1996 Sep 12;383(6596):185-8
- Welch MD, Drubin DG. A nuclear protein with sequence similarity to proteins implicated in human acute leukemias is important for cellular morphogenesis and actin cytoskeletal function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 1994 Jun; 5(6):617-32.
- White RJ, Rigby PW, Jackson SP. The TATA-binding protein is a general transcription factor for RNA polymerase III. *J Cell Sci Suppl*. 1992; 16:1-7.
- Wieczorek E, Brand M, Jacq X, Tora L. Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature*. 1998 May 14; 393(6681):187-91.
- Workman JL, Kingston RE. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:545-79
- Wu AL, Moye-Rowley WS. GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 5832–5839. (1994)
- Wu, S.-Y. and Chiang, C.-M. 1998. Properties of PC4 and an RNA polymerase II complex in directing activated and basal transcription *in vitro*. *J Biol Chem* 273:12492–12498.
- Yan C, Lee, LH, Davis LI. Crmlp mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J*. 17, 7416–7429, (1998).

- Zhang X, De Micheli M, Coleman ST, Sanglard D, Moye-Rowley WS. Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p. *Mol Microbiol.* 2000 May; 36(3):618-29.