

Le domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II : un pivot du métabolisme des ARN messagers en général et du VIH en particulier

**Olivier Bensaude
Sylvain Bellier
Marie-Françoise Dubois**

L'ARN polymérase II des eucaryotes est formée de plusieurs sous-unités. La plus grande possède un domaine carboxy-terminal (CTD) remarquable, composé de très nombreuses répétitions (26 chez la levure, 52 chez les mammifères) d'un motif conservé de sept acides aminés dont cinq peuvent être phosphorylés. Seul le CTD déphosphorylé permet l'assemblage de l'ARN polymérase II et des facteurs généraux de transcription sur les promoteurs. La phosphorylation du CTD par le facteur de transcription TFIIF est nécessaire à l'élongation de la transcription mais d'autres CTD-kinases semblent aussi impliquées. Le CTD phosphorylé servirait ensuite à recruter les systèmes enzymatiques impliqués dans la maturation des ARN pré-messagers. Dans une cellule, l'état de phosphorylation du CTD dépend d'une compétition entre des protéine kinases et des protéines phosphatases. Les conditions de croissance cellulaire affecteraient cet équilibre et pourraient ainsi moduler le métabolisme des ARN messagers.

ADRESSES

O. Bensaude : *docteur ès sciences, directeur de recherche à l'Inserm*. M.F. Dubois : *docteur ès sciences, directeur de recherche au Cnrs*. Laboratoire de génétique moléculaire, Ura Cnrs 1302, École normale supérieure, 46, rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France. S. Bellier : *docteur 3^e cycle, maître de conférence*. École nationale vétérinaire d'Alfort, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France.

TIRÉS À PART

O. Bensaude.

Trois ARN polymérases dépendantes de l'ADN ont été identifiées chez les eucaryotes. L'ARN polymérase I (ou A) engendre les ARN préribosomiaux, l'ARN polymérase II (ou B) synthétise les ARN pré-messagers et l'ARN polymérase III (ou C) produit des petits ARN, tels que les

ARN de transfert et l'ARN 5S. Malgré l'ancienneté relative de leur caractérisation, ces polymérases n'ont pas fini de nous étonner. En effet des résultats récents, accumulés par de nombreuses équipes, ont montré que le domaine carboxy-terminal (*carboxy-terminal domain*) (CTD) de la plus grande des sous-unités de l'ARN

polymérase II était un pivot autour duquel s'articulait la transcription des gènes de classe II puis leur maturation en ARN messagers.

Le CTD de l'ARN polymérase II est constitué de nombreuses répétitions d'un motif de sept acides aminés

Chacune des trois polymérases est formée d'une dizaine de sous-unités protéiques. Certaines sont spécifiques de chaque polymérase, d'autres sont communes aux trois. La plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II (ou RPB1 en référence à l'ARN polymérase B) est une protéine de plus de 200 kDa qui a été conservée au cours de l'évolution. Elle est l'homologue de la sous-unité β' de l'ARN polymérase bactérienne. Mais l'homologie ne concerne pas le domaine qui nous intéresse. Chez les levures, les plantes et les animaux, l'extrémité carboxy-terminale de RPB1 est composée de répétitions des sept acides aminés: Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. Remarqués d'abord par James Ingles (Toronto, Canada) et Jeffrey Corden (Baltimore, MD, USA), le nombre et la fidélité des répétitions sont frappants: de 26 à 27 répétitions chez les levures et jusqu'à 52 chez les mammifères (figure 1). Plus surprenant encore, le motif est le même quelle que soit l'espèce. Sur les sept acides aminés du motif, deux sont des prolines donc susceptibles d'engendrer des structures inhabituelles. Ces répétitions définissent d'emblée un domaine, le CTD, qui attire l'attention.

Un médiateur entre les facteurs de transcription et l'ARN polymérase II

Quelle peut bien être la fonction du CTD ? Cette question a d'abord été étudiée chez la levure par les groupes de James Ingles et de Richard Young (Boston, MA, USA). Les levures ne sont pas viables si le CTD comporte moins de 10 répétitions. L'induction de la transcription de certains gènes comme *INO1* ou *GAL10* est déficiente dans les mutants de levures au

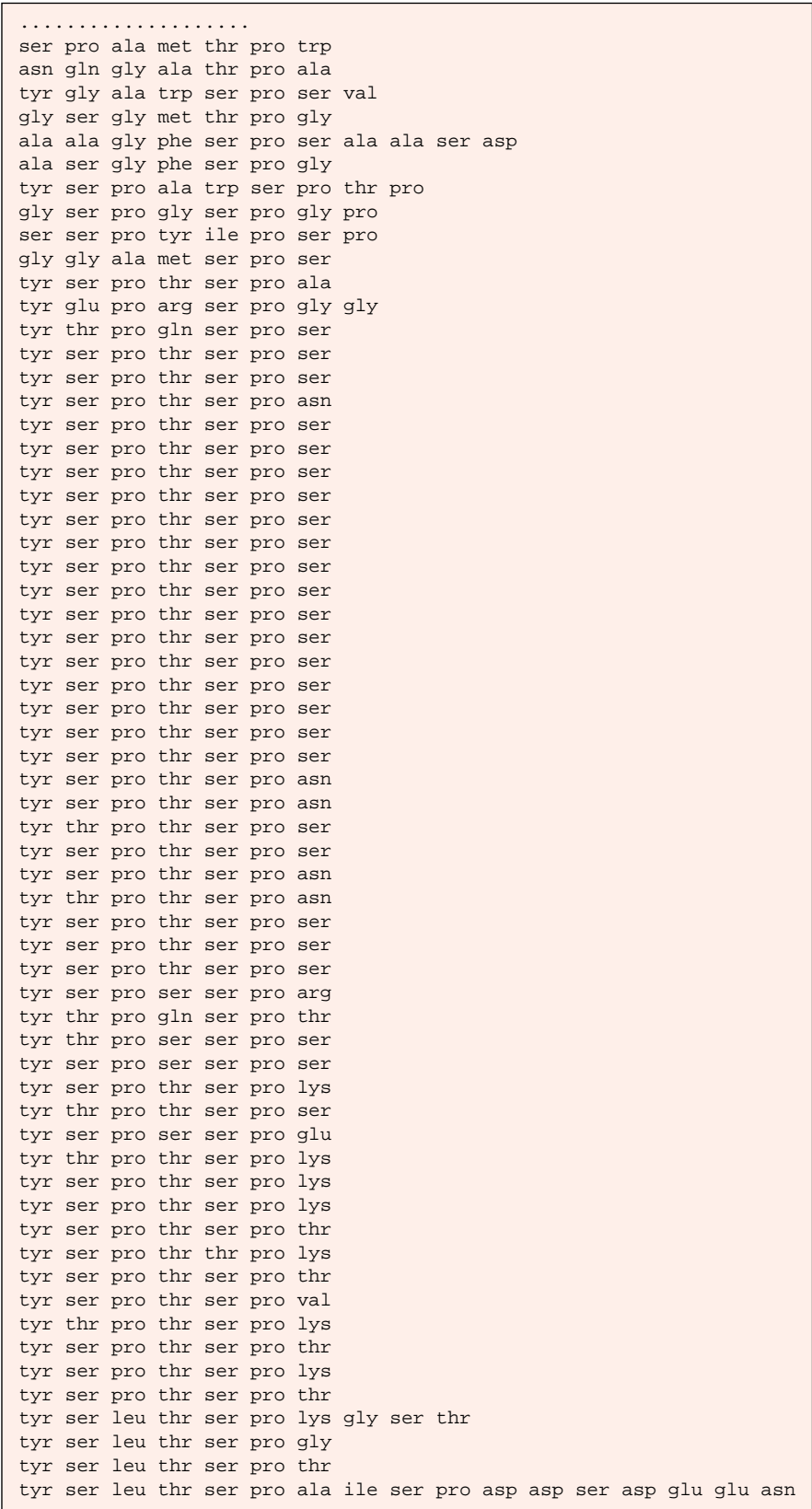


Figure 1. Le motif répété du CTD. Alignement des 440 derniers acides aminés de la grande sous-unité (RPB1) de l'ARN polymérase II humaine. (D'après [53].)

CTD tronqué (ne conservant que 10 à 12 répétitions). L'activation de la transcription de *GAL10* dépend du facteur de transcription à domaine acide, GAL4. Or, la troncature du CTD amplifie la perte de fonction de mutants de GAL4 possédant des suppressions dans le domaine acide. Inversement, une extension du CTD par l'ajout de répétitions surnuméraires compense partiellement cette perte de fonction. Par ailleurs, l'extension du domaine acide de GAL4 le rend moins sensible à la troncature du CTD. Chez les eucaryotes supérieurs, les groupes de Jeffrey Corden et Walter Schaffner (Zürich, Suisse) ont pu également montrer la nécessité du CTD pour une transcription dépendante d'activateurs (*enhancers*). De plus, le CTD est requis pour la transactivation du LTR du virus VIH par la protéine virale Tat et la transactivation du promoteur LTR du virus HTLV-I par la protéine Tax [1, 2]. Ces observations conduisent à la notion de « médiation » assurée par le CTD entre les activateurs de transcription et la polymérase.

Les levures – dont la polymérase n'a que 10 répétitions – ne poussent pas à basse température. Douze gènes suppresseurs de la cryosensibilité des mutants de délétion du CTD ont été isolés par Richard Young *et al.* [3]. Ces gènes ont été nommés *SRB* (*suppressor of RNA polymerase B*). Nous n'évoquerons ici que trois de ces gènes: *SIN1/SPT2* (ou *SRB1*). La protéine SIN1 est un répresseur de la transcription qui lie l'ADN de manière non spécifique et ressemble à HMG1, une protéine associée à la chromatine. La protéine SRB10 (ou UME5) est une protéine-kinase dépendant d'une cycline qui n'est autre que SRB11. Le couple SRB10/SRB11 et son homologue CDK8/cycline C (chez les eucaryotes supérieurs) phosphorylent le CTD *in vitro*. SRB10/SRB11 sont nécessaires à l'activation de la transcription par un transactivateur à domaine acide tel que GAL4.

À la suite des travaux des groupes de Richard Young, Roger Kornberg (Stanford, CA, USA) et Uli Schibler (Genève, Suisse), il est possible d'isoler des complexes multiprotéiques dénommés ARN polymérase II « holoenzymes » [4-6]. La nécessité

d'un promoteur pour l'assemblage des holoenzymes fait l'objet d'intenses débats. Quoi qu'il en soit, les différentes sous-unités de l'ARN polymérase II (le « cœur ») se retrouvent associées à un complexe dit « médiateur » constitué de la plupart des protéines codées par les gènes *SRB*, de facteurs généraux de la transcription tels que le TFIID, le TFIIF et des protéines du complexe SWI/SNF impliquées dans le remodelage de la chromatine (*m/s n° 1, vol. 9, p. 106*) [7]. Le CTD – qui interagit directement avec le TFIID et le TFIIF – serait un pivot autour duquel s'articuleraient la polymérase « cœur » et le médiateur.

La transcription des gènes de classe II requiert la phosphorylation du CTD par le facteur général de transcription, TFIIF

Parmi les 7 acides aminés du motif répété, 5 sont des accepteurs de phosphate: en effet le motif compte 3 sérines, 1 thréonine et 1 tyrosine. Il n'est donc pas surprenant de constater que le CTD est hautement phosphorylable *in vitro* et *in vivo* [8]. Cette phosphorylation est relativement facile à étudier car elle entraîne d'importantes variations de la mobilité de RPB1 en électrophorèse. Les acides aminés phosphorylés sur le CTD sont essentiellement des sérines, mais on trouve aussi des thréonines et quelques tyrosines [9]. D'autres modifications post-traductionnelles du CTD ont été décrites: (1) lorsque le CTD n'est pas ou peu phosphorylé, il peut être O-glycosylé; (2) le CTD peut aussi être polyubiquitinylé dans des cellules irradiées par les UV [10, 11].

D'après un modèle formulé par Michael Dahmus (Davis, CA, USA) [8], la transcription s'accompagne d'un cycle de phosphorylation/déphosphorylation de la polymérase (*figure 2*): le CTD n'est pas phosphorylé lorsque la polymérase se fixe sur un promoteur lors de la formation du complexe de préinitiation de la transcription (*figure 2A*), puis le CTD est phosphorylé lorsque la polymérase est engagée en élongation de la transcription (*figure 2B, C*). La forma-

tion d'un complexe de préinitiation implique une association entre la polymérase et le facteur TFIID qui reconnaît la boîte TATA. Cette association peut être reproduite *in vitro*, mais ne s'observe pas lorsque le CTD est phosphorylé. D'une manière générale, le médiateur ne s'associerait qu'au CTD déphosphorylé [12]. Or, le CTD est phosphorylé par l'un des facteurs qui s'associent à la polymérase pour former le complexe de préinitiation, le facteur TFIIF (*m/s n° 6, vol. 11, p. 879*) [13]. Ce facteur, caractérisé par les groupes de Roger Kornberg et de Jean-Marc Egly (Strasbourg, France) est constitué de 9 sous-unités dont l'une est une protéine-kinase (KIN28, chez *S. cerevisiae*, CDK7 chez les eucaryotes supérieurs) et une autre la cycline correspondante (CCL1 chez *S. cerevisiae*, cycline H chez les eucaryotes supérieurs) [13]. Chez la levure, l'inactivation de KIN28 dans les mutants *kin28^{ts}* [14, 15] ou *ccl1^{ts}*, isolés par le groupe de Gérard Faye (Orsay, France), provoque l'arrêt de la synthèse des ARN de classe II. Dans ces mutants, l'élongation de la transcription est déficiente [16]. En outre, la micro-injection d'anticorps anti-CDK7 inhibe la transcription dans des cellules de vertébrés, en bloquant l'élongation [17, 18]. Certains facteurs de transcription facilitent l'association de TFIIF au complexe de préinitiation de la transcription. Cependant, ainsi que nous le discutons plus loin, le facteur TFIIF n'est pas le seul à phosphoryler la polymérase pour lui permettre d'effectuer l'élongation de la transcription.

La phosphorylation du CTD module la transactivation du LTR du VIH

À la suite d'une série de publications spectaculaires, le promoteur LTR du VIH est devenu le système dans lequel le rôle de la phosphorylation du CTD est sans doute le mieux compris. À la fin des années 1980, en utilisant le DRB (*dichloro-ribofuranosylbenzimidazole*), Philip Sharp avait établi, par des travaux fondateurs, que deux types de complexes de transcription se forment sur ce promoteur: les uns sont peu sensibles et produisent surtout des transcrits

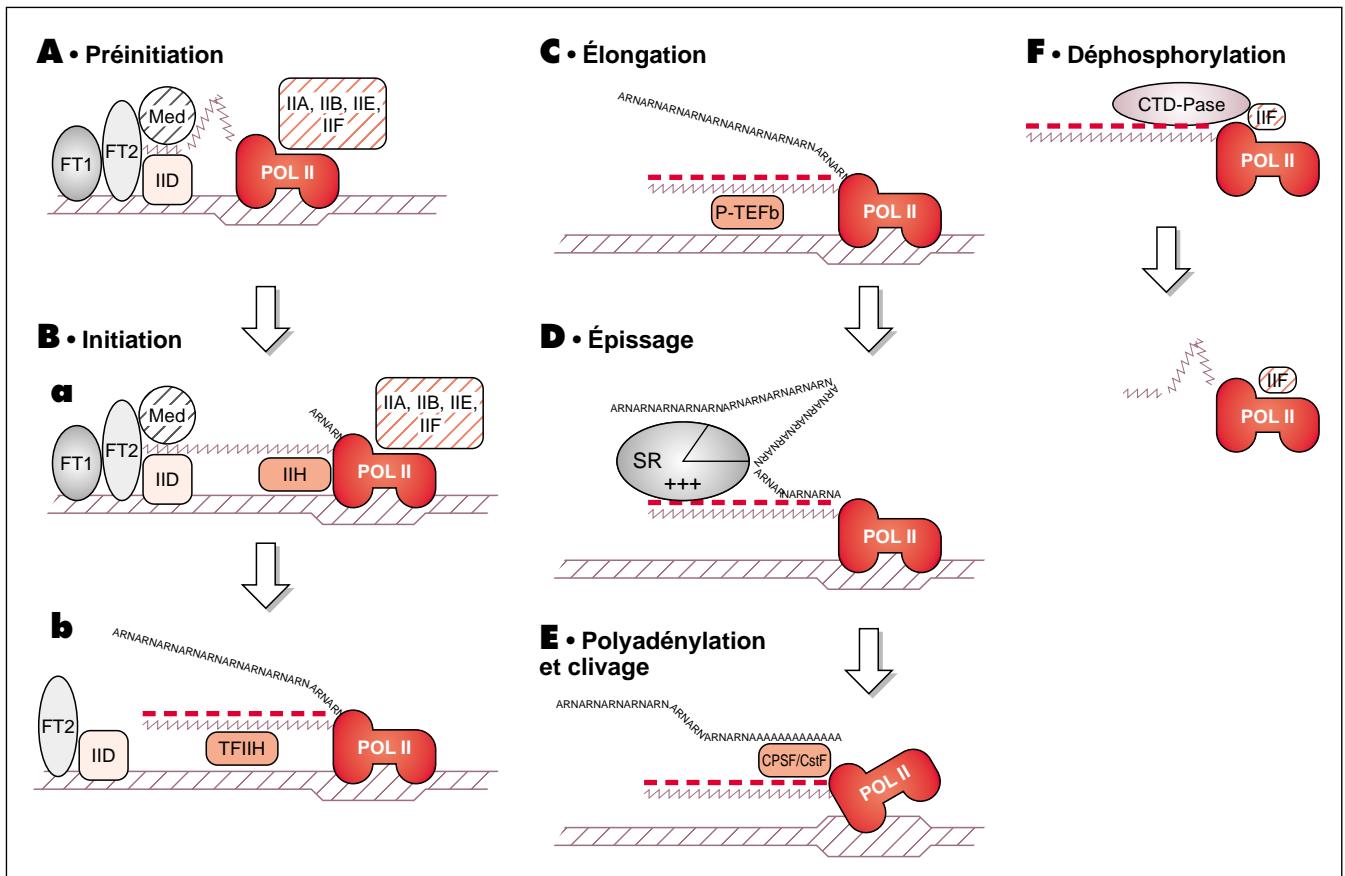


Figure 2. **Cycle de phosphorylation/déphosphorylation du CTD.** **A. Préinitiation.** Les facteurs activateurs de la transcription (FT 1) et (FT 2), le facteur général de transcription TFIID (constitué de la TATA binding protein et des TAF (transcription activating factors)) dirigent l'assemblage d'un complexe de préinitiation constitué de l'ARN polymérase II (POL II), du complexe médiateur (Med) et des facteurs généraux de la transcription TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIH et TFIIF. Le CTD, non phosphorylé (en bistre) interagit avec le complexe médiateur (Med), TFIID et TFIIH. **B. Initiation.** **a.** La transcription de quelques bases démarre, le CTD n'est pas phosphorylé. **b.** Le CTD (en rouge) est phosphorylé par la kinase du facteur TFIIH. Cette phosphorylation provoque la rupture des interactions entre le CTD, TFIID et le complexe médiateur; elle est nécessaire pour assurer l'élongation de la transcription. **C. Élongation.** Le facteur d'élongation, pTEFb, est aussi une CTD-kinase qui pourrait contribuer à la phosphorylation de l'ARN polymérase. **D. Épissage.** Le spliceosome viendrait s'ancre sur le CTD phosphorylé (chargé négativement [-]) par l'intermédiaire des protéines SR (riches en arginine et chargées positivement [+]). Cet ancrage relayé par le CTD assurerait un couplage entre transcription et épissage. **E. Polyadénylation et clivage.** Les facteurs CPSF et CstF, responsables du clivage et de la polyadénylation des ARN, viendraient s'ancre à leur tour sur le CTD phosphorylé. **F. Déphosphorylation.** La déphosphorylation du CTD par une CTD phosphatase (CTD Pase) interviendrait ultérieurement et serait facilitée par l'association du facteur général de la transcription TFIIF avec la polymérase. L'ARN polymérase déphosphorylée pourrait recruter les facteurs généraux de transcription et les protéines du médiateur pour former un nouveau complexe de préinitiation.

courts ou abortifs; les autres, favorisés par la protéine Tat, sont fortement inhibés par le DRB et produisent des transcrits longs qui conduisent à la transcription complète du génome viral. L'action de la protéine Tat codée par un gène du VIH, commence par sa liaison à la région palindromique TAR présente à l'extrémité 5' de l'ARN viral. L'interaction de Tat avec l'ARN TAR

serait transitoire, mais la protéine Tat resterait liée à la polymérase engagée en élongation de la transcription [19]. Tat s'associe au CTD et en stimule la phosphorylation par le TFIIH parallèlement à l'activation de l'élongation de la transcription du LTR du VIH [2, 20, 21, 22]. Tat s'associerait ensuite à une nouvelle CTD-kinase, la TAK (*Tat-associated-kinase*). CDK7, la CTD-kinase du

TFIIH et, plus encore la TAK sont inhibées par le DRB, mais surtout le groupe d'Oswaldo Flores de Tularik Inc. (San Francisco, USA) vient de trouver 11 inhibiteurs de l'activation par Tat parmi 100 000 produits criblés; or, ces 11 composés (parmi lesquels, le DRB) inhibent tous la TAK avec des efficacités relatives identiques à l'inhibition de Tat [23]. La CTD-kinase de la TAK a été identi-

fiée ; c'est une nouvelle kinase dépendante des cyclines, PITALRE qui devrait être appelée CDK9 [24, 25]. Or, PITALRE se trouve être la CTD-kinase du facteur d'élongation P-TEFb, caractérisée par le groupe de David Price (Iowa, USA). D'autre part, la stimulation des lymphocytes favorise la transcription du VIH et s'accompagne d'une activation de PITALRE/CDK9 [25]. Pour résumer cette avalanche d'observations, Katherine Jones (La Jolla, USA) propose le modèle suivant: la protéine Tat stimulerait le démarrage de la transcription en activant la phosphorylation du CTD par la kinase CDK7 du facteur TFIID, mais cette phosphorylation serait partielle et, en recrutant à son tour la kinase PITALRE/CDK9 du facteur P-TEFb, Tat assurerait une phosphorylation plus complète permettant une plus grande efficacité de l'élongation de la transcription [26]. Tat jouerait le rôle d'un coordonnateur, en s'associant, d'une part, à des facteurs généraux de la transcription tels que le TFIID, le TFIID, le P-TEFb et, d'autre part, à l'ARN polymérase II via le CTD. Comme les activateurs transcriptionnels E1A et VP16 s'associent pour leur part à CDK8, la CTD-kinase du complexe « médiateur » [27], il est donc probable que le recrutement des CTD-kinases, CDK7, CDK8 et CDK9, par les facteurs de transcription, fasse partie d'un mécanisme général de régulation de la transcription.

La phosphorylation du CTD facilite le recrutement des facteurs de maturation des ARN pré-messagers

Dès 1990, Jeffrey Corden suggéra que le CTD pourrait jouer un rôle dans l'épissage et, en 1993, le groupe d'Arno Greenleaf (Durham, NC, USA) remarqua que des protéines impliquées dans l'épissage étaient co-localisées avec l'isoforme phosphorylée de la polymérase sur les chromosomes polytènes de drosophile. Des expériences récentes de biologie moléculaire ont montré l'implication du CTD dans la maturation des messagers [28]. Chez les mammifères aussi, des isoformes phosphorylées

de la polymérase sont co-localisées avec des protéines impliquées dans l'épissage; des polymérases au CTD phosphorylé ont été copurifiées avec des constituants des *spliceosomes* [29-31] et des protéines susceptibles de participer à l'épissage ont été isolées par la technique des double-hybrides en utilisant le CTD comme amorce [32, 33]. En outre, la surexpression d'une protéine de fusion contenant le CTD perturbe la distribution des facteurs d'épissage et inhibe l'épissage de l'ARN de β -globine [34]. Inversement, le groupe de David Bentley (Toronto, Canada) a montré que des ARN transcrits par des polymérases au CTD tronqué ne sont ni épissés, ni polyadénylés [35]. Il faut remarquer ici que, chez la levure, SRB10/UME5, la CTD-kinase du médiateur, est un régulateur de la stabilité d'ARN spécifiques de la méiose [36]. De plus, le CTD phosphorylé recrute les enzymes responsables de la coiffe en 5' des ARN pré-messagers [37]. L'ensemble de ces résultats renforce les concepts plus anciens de couplage entre transcription et coiffe, entre transcription et épissage. Ainsi, le CTD phosphorylé se comporte comme un pivot autour duquel s'articule la transcription et la maturation des ARN messagers (*figure 2D, E*).

De multiples CTD-kinases et CTD-phosphatases

De multiples protéine-kinases phosphorylent le CTD *in vitro* [8]. C'est le cas de plusieurs kinases dépendantes des cyclines (CDK), des MAP-kinases de type ERK, de la protéine kinase dépendante de l'ADN (ADN-PK) et de la tyrosine-kinase c-Abl. Plusieurs CTD-kinases purifiées sont en cours de caractérisation. En revanche, seul Michael Dahmus a décrit une CTD-phosphatase, sans doute parce que les phosphatases sont plus difficiles à étudier. Cependant, cette unique CTD phosphatase est particulièrement intéressante car très spécifique, et son activité est modulée par le facteur général de transcription, TFIIF [38]. Bien que CDK1 (*cdc2*) ait été la première CTD-kinase identifiée, il n'existe pas d'argument en faveur de son action sur le CTD *in vivo*. La même situation prévaut pour la plupart des autres CTD-kinases caracté-

sées à ce jour. Les très fortes présumptions impliquant CDK7 *in vivo* font donc exception: (a) comme l'a montré le groupe de Jean-Marc Egly, CDK7 (aussi nommée MO15) et la cycline H constituent deux des sous-unités du facteur général de transcription TFIID chez les vertébrés (*m/s n° 6, vol. 11, p. 879*) et, comme l'a montré le groupe de Roger Kornberg, KIN28, homologue de CDK7, et CCL1, homologue de la cycline H, font partie du TFIID chez la levure *S. cerevisiae*; (b) le CTD est déphosphorylé en quelques minutes lorsque les levures mutantes *kin28^{ts}* ou *ccl1^{ts}* sont placées à température non permissive [15, 39]; (c) le CTD est déphosphorylé en quelques minutes dans des cellules de mammifères exposées à des inhibiteurs de CDK7 [40].

Le couple CDK7/cycline H est un composant essentiel des cellules eucaryotes et ses fonctions ne se limitent pas à la phosphorylation du CTD. Comme l'ont montré Marcel Dorée (Montpellier, France) et Erich Nigg (Genève, Suisse), il pourrait aussi intervenir dans le cycle cellulaire des eucaryotes supérieurs et de la levure *S. pombe* par son activité CAK (*cyclin-dependent kinase-activating-kinase*) [41]. En revanche, chez *S. cerevisiae*, l'activité CAK est portée par une kinase, Civ1/Cak1, distincte de KIN28 [42]. De même, les fonctions du TFIID ne se limitent pas à la transcription; elles sont aussi indispensables à la réparation de l'ADN par excision de nucléotides, mais l'activité CTD-kinase n'est pas nécessaire pour ce processus [13].

Modifications du CTD pendant le stress et le développement, un nouveau substrat des MAP-kinases

Les *stress* et certains programmes de développement sont accompagnés d'importantes variations de l'activité transcriptionnelle; peut-on imaginer une modulation de l'activité transcriptionnelle à travers la phosphorylation du CTD? Dans des fibroblastes quiescents ou en croissance exponentielle, on trouve des quantités équivalentes de polymérase avec un CTD déphosphorylé (forme IIa) et un CTD hyperphosphorylé (forme IIo).

Cette distribution est altérée en réponse à des facteurs de croissance, pendant la méiose ou lorsque les cellules sont exposées à des *stress*. L'ajout de facteurs de croissance à des fibroblastes quiescents accroît l'hyperphosphorylation du CTD, du fait de l'activation de CTD-kinases distinctes du TFIIF; il pourrait s'agir des MAP-kinases de type ERK [43]. Avec Geneviève Almouzni (Institut Curie, Paris), nous avons aussi observé une hyperphosphorylation du CTD pendant la méiose chez le *xénope* et, là encore, les MAP-kinases de type ERK sont de bonnes candidates [44]. Après la fécondation, les MAP-kinases sont rapidement désactivées et le CTD est déphosphorylé. La signification biologique de ces observations demeure encore mal comprise puisque la phosphorylation du CTD par les MAP-kinases coïncide avec un arrêt de la transcription (méiose) ou une stimulation de la transcription (facteurs de croissance). Chez les mammifères, comme nous l'avons montré avec Sylvie Chastant et Jean-Paul Renard (Inra, Jouy-en-Josas), la restauration d'une phosphorylation « normale » du CTD précède la remise en route du génome qui se produit plusieurs heures après la fécondation [45]. L'infection de cellules par le poliovirus [46] ou par le virus de l'herpès [47] provoque la déphosphorylation du CTD. Dans les deux cas, la déphosphorylation du CTD coïncide avec l'arrêt de la transcription cellulaire. Le poliovirus provoque la dégradation de la TBP (TATA box binding protein) [48]; de ce fait, le complexe d'initiation de la transcription ne se formerait pas. Les effets du choc thermique sont plus complexes: un choc modéré provoque la déphosphorylation du CTD, un choc extrême provoque une hyperphosphorylation mais sur des sites distincts [49, 50]. En réalité, deux phénomènes se superposent: la CTD-kinase associée au TFIIF serait inactivée par le choc thermique [51], et une autre CTD-kinase serait activée [49, 50]. Or, d'une part, la disparition de la protéine KIN28 chez la levure *S. cerevisiae* n'affecte pas la transcription des gènes de choc thermique (J. Lis, communication personnelle) et, d'autre part, l'isoforme phosphorylée de RPB1 que l'on trouve associée au *spli-*

cosome disparaît; cette disparition pourrait être liée à l'arrêt de l'épissage observé dans ces conditions, mais les gènes de choc thermique ne présentent pas d'introns. C'est pourquoi, à l'inverse des autres gènes, les gènes de *stress* n'auraient pas besoin de l'activité CTD-kinase du TFIIF.

Conclusion

Le domaine CTD de l'ARN polymérase II est un pivot qui assure l'intégration des différentes étapes du métabolisme des ARN messagers. La phosphorylation de ce domaine semble moduler le passage des différentes étapes, de la transcription des gènes à la maturation des ARN messagers. Il est possible de distinguer des similitudes fonctionnelles entre transcription et traduction [52]. Or, il est bien établi que la traduction des ARN messagers en protéines est contrôlée par des phosphorylations. Ainsi, la phosphorylation de la sous-unité S6 du ribosome et des facteurs d'initiation, eIF-2 α et eIF-4E affectent le démarrage de la traduction et modulent la sélectivité de la traduction de certaines classes de messagers. Ces phosphorylations sont sensibles aux conditions de croissance du fait de l'activation ou de l'inactivation de protéine-kinases parmi lesquelles les MAP kinases jouent un rôle important. De même, la phosphorylation de composants de base de la machinerie transcriptionnelle serait sensible aux conditions de croissance et pourrait contribuer à la régulation de l'expression génétique. Cette régulation se superposerait à celle conférée par les facteurs de transcription ■



RÉFÉRENCES

1. Okamoto H, Sheline CT, Corden JL, Jones KA, Peterlin BM. Trans-activation by human immunodeficiency virus Tat protein requires the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11575-9.
2. Chun RF, Jeang KT. Requirements for RNA polymerase II carboxyl-terminal domain for activated transcription of human retroviruses human T-cell lymphotropic virus I and HIV-1. *J Biol Chem* 1996; 271: 27888-94.
3. Koleske AJ, Young RA. The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 113-6.
4. Roeder RG. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 327-35.
5. Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* 1996; 10: 2657-83.
6. Greenblatt J. RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 310-9.
7. Björklund S, Kim YJ. Mediator of transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 335-7.
8. Dahmus ME. Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 1996; 271: 19009-12.
9. Baskaran R, Chiang GG, Wang JYJ. Identification of a binding site in c-abl tyrosine kinase for the C-terminal repeated domain of RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3361-9.
10. Bregman DB, Halaban R, Van Gool AJ, Henning KA, Friedberg EC, Warren SL. UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11586-90.
11. Huibregtse JM, Yang JC, Beaudenon SL. The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3656-61.
12. Svejstrup JQ, Li Y, Fellows J, Gnatt A, Björklund S, Kornberg R. Evidence for a mediator cycle at the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6075-8.
13. Svejstrup JQ, Vichi P, Egly JM. The multiple roles of transcription/repair factor TFIIF. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 346-50.
14. Cismowski MJ, Laff GM, Solomon MJ, Reed SI. KIN28 encodes a C-terminal domain kinase that controls mRNA transcription in *Saccharomyces cerevisiae* but lacks cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) activity. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2983-92.
15. Valay JG, Simon M, Dubois MF, Bensaude O, Facca C, Faye G. The KIN28 gene is required both for RNA polymerase II mediated transcription and phosphorylation of the Rpb1p CTD. *J Mol Biol* 1995; 249: 535-44.
16. Akhtar A, Faye G, Bentley DL. Distinct activated and non-activated RNA polymerase II complexes in yeast. *EMBO J* 1996; 15: 4654-64.

RÉFÉRENCES

17. Roy R, Adamczewski JP, Seroz T, Vermeulen W, Tassan JP, Schaeffer V, Nigg EA, Hoeijmakers JH, Egly JM. The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIF transcription-DNA repair factor. *Cell* 1994; 79: 1093-101.
18. Yankulov KY, Pandes M, McCracken S, Bouchard D, Bentley DL. TFIIF functions in regulating transcriptional elongation by RNA polymerase II in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3291-9.
19. Keen N, Churcher M, Karn J. Transfer of Tat and release of TAR RNA during the activation of the human immunodeficiency virus type-1 transcription elongation complex. *EMBO J* 1997; 16: 5260-72.
20. Parada CA, Roeder RG. Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature* 1996; 384: 375-8.
21. Garcia-Martinez LF, Mavankal G, Neveu JM, Lane WS, Ivanov D, Gaynor RB. Purification of a Tat-associated kinase reveals a TFIIF complex that modulates HIV-1 transcription. *EMBO J* 1997; 16: 2836-50.
22. Cujec T, Okamoto H, Fujinaga K, Meyer J, Chamberlin H, Morgan DO, Peterlin BM. The HIV transactivator TAT binds to the CDK-activating kinase and activates the phosphorylation of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev* 1997; 11: 2645-57.
23. Mancebo HS, Lee G, Flygare J, Tomassini J, Luu P, Zhu Y, Peng J, Blau C, Hazuda D, Price D, Flores O. P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation *in vivo* and *in vitro*. *Genes Dev* 1997; 11: 2633-44.
24. Zhu Y, Pe'ery T, Peng J, Ramanathan Y, Marshall N, Marshall T, Amendt B, Mathews MB, Price DH. Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 Tat transactivation *in vitro*. *Genes Dev* 1997; 11: 2622-32.
25. Yang X, Gold MO, Tang DN, Lewis DE, Aguilar-Cordova E, Rice AP, Herrmann CH. TAK, an HIV Tat-associated kinase, is a member of the cyclin-dependent family of protein kinases and is induced by activation of peripheral blood lymphocytes and differentiation of promonocytic cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12331-6.
26. Jones KA. Taking a new TAK on Tat transactivation. *Genes Dev* 1997; 11: 2593-9.
27. Gold MO, Tassan JP, Nigg EA, Rice AP, Herrmann CH. Viral transactivators E1A and VP16 interact with a large complex that is associated with CTD kinase activity and contains CDK8. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 3771-7.
28. Steinmetz EJ. Pre-mRNA processing and the CTD of RNA polymerase II: the tail that wags the dog? *Cell* 1997; 89: 491-4.
29. Vincent M, Lauriault P, Dubois MF, Lavoie S, Bensaude O, Chabot B. The nuclear matrix protein p255 is a highly phosphorylated form of RNA polymerase II largest subunit which associates with the spliceosome. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 4649-52.
30. Mortillaro MJ, Blencowe BJ, Wei X, Nakayasu H, Du L, Warren SL, Sharp PA, Berezney R. A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8253-7.
31. Kim E, Du L, Bregman DB, Warren SL. Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA. *J Cell Biol* 1997; 136: 19-28.
32. Yuryev A, Patturajan M, Litingtung Y, Joshi RV, Gentile C, Gebara M, Corden JL. The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6975-80.
33. Bourquin JP, Stagljar I, Meier P, Moosman P, Silke J, Baechi T, Georgiev O, Schaffner O. A serine/arginine-rich nuclear matrix cyclophilin interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2055-61.
34. Du L, Warren SL. A functional interaction between the Carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* 1997; 136: 5-18.
35. McCracken S, Fong N, Yankulov K, Ballantyne S, Pan G, Greenblatt J, Patterson SD, Wickens M, Bentley DL. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 1997; 385: 357-61.
36. Surosky RT, Strich R, Esposito RE. The yeast *UME5* gene regulates the stability of meiotic mRNAs in response to glucose. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 3446-58.
37. Shuman S. Origins of mRNA identity: capping enzymes bind to the phosphorylated C-terminal domain of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12758-60.
38. Chambers RS, Wang BQ, Burton ZF, Dahmus ME. The activity of COOH-terminal domain phosphatase is regulated by a docking site on RNA polymerase II and by the general transcription factors IIF and IIB. *J Biol Chem* 1995; 270: 14962-9.
39. Valay JG, Dubois MF, Bensaude O, Faye G. Ccl1, a cyclin associated with protein kinase Kin28 controls the phosphorylation of RNA polymerase II largest subunit and mRNA transcription. *CR Acad Sci Paris* 1996; 319: 183-90.
40. Dubois MF, Nguyen VT, Bellier S, Bensaude O. Inhibitors of transcription such as 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosyl benzimidazole (DRB) and isoquinoline sulfonamide derivatives (H-8 and H-7*), promote the dephosphorylation of the C-terminal domain (CTD) of RNA polymerase II largest subunit. *J Biol Chem* 1994; 269: 13331-6.
41. Sclafani RA. Cyclin dependent kinase activating kinases. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 788-94.
42. Thuret JY, Valay JG, Faye G, Mann C. Civi (CAK *in vivo*), a novel cdk-activating kinase. *Cell* 1996; 86: 565-76.
43. Dubois MF, Nguyen VT, Dahmus ME, Pagès G, Pouysségur J, Bensaude O. Enhanced phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II upon serum stimulation of quiescent cells: possible involvement of MAP kinases. *EMBO J* 1994; 13: 4787-97.
44. Bellier S, Dubois MF, Nishida E, Almouzni G, Bensaude O. Phosphorylation of RNA polymerase II largest subunit during *Xenopus laevis* oocyte maturation. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 1434-40.
45. Bellier S, Chastant S, Adenot P, Vincent M, Renard JP, Bensaude O. Nuclear translocation and carboxyl-terminal domain phosphorylation of RNA polymerase II delineate the two phases of zygotic gene activation in mammalian embryos. *EMBO J* 1997; 16: 6250-62.
46. Rangel LM, Fernandez-Thomas C, Dahmus ME, Gariglio P. Poliovirus-induced modification of host cell RNA polymerase IIO is prevented by cycloheximide and zinc. *J Biol Chem* 1988; 263: 19267-9.
47. Rice SA, Long MC, Lam V, Spencer CA. RNA polymerase II is aberrantly phosphorylated and localized to viral replication compartments following Herpes Simplex virus infection. *J Virol* 1994; 68: 988-1001.
48. Clark ME, Lieberman PM, Berk AJ, Dasgupta A. Direct cleavage of TATA-binding protein by poliovirus protease 3C *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 1232-7.
49. Dubois MF, Bellier S, Seo SJ, Bensaude O. Phosphorylation of the RNA polymerase II largest subunit during heat-shock and inhibition of transcription in HeLa cells. *J Cell Physiol* 1994; 158: 417-26.
50. Venetianer A, Dubois MF, Nguyen VT, Seo SJ, Bellier S, Bensaude O. Phosphorylation state of RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) in heat-shocked cells. Possible involvement of the stress activated MAP kinases. *Eur J Biochem* 1995; 233: 83-92.
51. Dubois MF, Vincent M, Adamczewski J, Egly JM, Bensaude O. Heat shock inactivation of the TFIIF-associated kinase and change in the phosphorylation sites on RNA polymerase II largest subunit. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 694-700.
52. Sachs A, Buratowski S. Common themes in translational and transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 189-92.
53. Wintzerith M, Acker J, Vicaire S, Vigneron M, Kedinger C. Complete sequence of the human RNA polymerase II largest subunit. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 910.

TROISIÈME CONFÉRENCE ANNUELLE PHARMACIE – Jeudi 5 février 1998

Les Échos Conférences organise en collaboration avec Cap Gemini/Bossard Gemini Consulting la troisième conférence annuelle :

INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE EN FRANCE : LES STRATÉGIES DE CROISSANCE

qui se déroulera le jeudi 5 février 1998 de 8 h 45 à 17 h 30 au Pavillon Gabriel.

Renseignements : Stéphanie Hussenot – Les Échos Conférences – Tél. : 01 49 53 67 69 – Fax : 01 45 63 73 58

Summary

The carboxy-terminal domain (CTD) of RNA polymerase II plays a pivotal role in messenger RNA metabolism

RNA polymerase (RNAP) II is a multisubunit enzyme composed of several different subunits. The largest subunit shows an intriguing carboxy-terminal domain (CTD) which consists in multiple repeats of a seven amino-acid motif. The same motif is repeated 26 times in the yeast protein and up to 52 times in the mammalian protein. An unphosphorylated CTD is essential for the assembly of RNA polymerase and general transcription factors into a preinitiation complex of transcription on promoters. Phosphorylation of the CTD by the transcription factor TFIIF is required to elongate transcription, but other CTD kinases may also contribute to it. The CTD is also required for pre-mRNA splicing and polyadenylation. But in this case, phosphorylation of the CTD is necessary to associate the splicing machinery. In cells, the phosphorylation status of the CTD of the largest subunit is tightly regulated by a balance between protein kinases and phosphatases. Environmental and developmental programs influence this balance and may thus directly influence the overall mRNA metabolism.

