

Université de Montréal

Phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II et impact de l'histone H2A.Z sur le
positionnement des nucléosomes chez *S. cerevisiae*

par
Maxime Bergeron

Programmes de biologie moléculaire
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences
en biologie moléculaire

Octobre 2008

© Maxime Bergeron, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II et impact de l'histone H2A.Z sur le
positionnement des nucléosomes chez *S. cerevisiae*

présenté par :

Maxime Bergeron

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Martine Raymond
président-rapporteur

François Robert
directeur de recherche

Alain Verreault
membre du jury

Résumé

La phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II permet à ce complexe protéique d'exécuter la transcription des gènes, en plus de coupler à la transcription des événements moléculaires comme la maturation des ARNm. Mes résultats montrent que même si cette phosphorylation suit un patron similaire à l'ensemble des gènes, il existe des exceptions pouvant être dues à des mécanismes alternatifs de phosphorylation du CTD. Le présent ouvrage s'intéresse également au rôle qu'occupe la variante d'histone H2A.Z dans l'organisation de la chromatine. Des études précédentes ont montré que le positionnement de certains nucléosomes le long de l'ADN serait influencé par H2A.Z et aurait une influence sur la capacité de transcrire les gènes. Par une approche génomique utilisant les puces à ADN, j'ai cartographié l'impact de la délétion de H2A.Z sur la structure des nucléosomes. Enfin, des résultats intéressants sur la dynamique d'incorporation de H2A.Z à la chromatine ont été obtenus.

Mots clés : génome, génomique, transcription, expression, chromatine, puce à ADN, microarray, levure, HTZ1

Abstract

RNA Polymerase II is the molecular complex responsible for the transcription of class II genes. Proper transcription and associated events such as mRNA processing are thought to require the phosphorylation of its C-terminal domain. Here I show that this phosphorylation follows a similar pattern for most of the genes, although some exceptions exist. These exceptions could be explained by alternative phosphorylation mechanisms. Also, this work provides data on how the variant histone H2A.Z influences chromatin structure. Previous studies have shown a role for H2A.Z in the positioning of some nucleosomes along the DNA, which would impact the ability to transcribe genes. Here I used a microarray technology to profile nucleosome positions in a genome-wide manner. My data provide further evidence that H2A.Z influences nucleosome positioning. Interesting results regarding the dynamics of H2A.Z incorporation into chromatin are also shown.

Keywords : genome, genomics, transcription, expression, chromatin, DNA chip, microarray, yeast, HTZ1

Table des matières

1. Introduction.....	01
1.1 Localisation génomique des isoformes phosphorylées de l'ARN polymérase II.....	01
Objectif no. 1.....	05
1.2 Étude fonctionnelle de la variante d'histone H2A.Z.....	05
1.2.1 Les modèles possibles de la régulation transcriptionnelle par H2A.Z.....	10
Objectif no. 2.....	13
1.2.2 Dynamique d'incorporation de H2A.Z dans la chromatine.....	13
Objectif no. 3.....	16
2. Résultats : localisation génomique des isoformes phosphorylées de l'ARN polymérase II.....	17
3. Résultats : implication de H2A.Z dans le positionnement des nucléosomes.....	41
4. Résultats : dynamique d'incorporation de H2A.Z dans la chromatine.....	56
5. Discussion.....	63
6. Matériel et méthodes.....	70
7. Références.....	84

Liste des tableaux

Tableau I : Processus et composantes communs aux gènes composant les groupes d'exceptions.....	33
Tableau II : Gènes exceptionnels (liste filtrée par inspection systématique).....	35

Liste des figures

Figure 1 : Alignement des séquences protéiques des histones H2A et H2A.Z humaines.....	08
Figure 2 : Alignement des nucléosomes sur le codon d'initiation dans deux groupes de promoteurs.....	11
Figure 3 : Criblage des intégrations correctes du fragment inséré en C-terminal du gène <i>RPB1</i>	19
Figure 4 : Vérification de la reconnaissance de la sous-unité <i>RPB1-9myc</i> par l'anticorps c-Myc.....	20
Figure 5 : Concordance des valeurs d'enrichissement des réplicats biologiques.....	22
Figure 6 : Enrichissement combiné à partir de deux réplicats de chaque anticorps.....	24
Figure 7 : Le gène <i>PGK1</i> est représentatif de la majorité des gènes du génome de <i>S. cerevisiae</i>	25
Figure 8 : Séparation des gènes de <i>S. cerevisiae</i> en 6 classes, en fonction de leur niveau de transcription.....	26
Figure 9 : Distribution moyenne des enrichissements.....	27
Figure 10 : Exemple de gène possédant un enrichissement exceptionnellement faible de l'anticorps 8WG16.....	29
Figure 11 : Distribution des gènes en fonction de leur différence d'enrichissement entre c-Myc et 8WG16.....	30
Figure 12 : Détermination des caractéristiques communes aux gènes possédant un même type d'exception.....	31

Liste des figures (suite)

Figure 13 : Exemples représentatifs des exceptions d'enrichissement retenues après inspection visuelle.....	36
Figure 14 : Vérification des enrichissements de deux gènes exceptionnels par CHIP-qPCR.....	40
Figure 15 : Isolation et digestion de l'ADN par la MNase afin de déterminer la position des nucléosomes.....	43
Figure 16 : Concordance de la position des nucléosomes entre les deux réplicats des souches W303 et <i>htz1Δ</i>	44
Figure 17 : La délétion de H2A.Z entraîne la disparition ou le déplacement de certains nucléosomes.....	46
Figure 18 : Alignement des nucléosomes sur le site d'initiation de la transcription (TSS).....	51
Figure 19 : Corrélation directe et inverse entre la présence des nucléosomes sur l'ORF et le niveau de transcription.....	52
Figure 20 : Comparaison des méthodes de marquage et des plate-formes d'hybridation.....	55
Figure 21 : Criblage de l'intégration correcte du promoteur tet en amont du gène <i>HTZ1</i>	57
Figure 22 : Répression et induction de H2A.Z dans la souche tet- <i>HTZ1</i> -3myc.....	60
Figure 23 : Isolation de la chromatine par ultracentrifugation.....	61
Figure 24 : Incorporation de H2A.Z à la chromatine suite à son induction dans la souche tet- <i>HTZ1</i> -3myc.....	62

Abréviations

Activité ATPase : activité d'hydrolase de l'adénosine triphosphate

ADN : acide désoxyribonucléique (anglais : DNA)

ARN : acide ribonucléique (anglais : RNA)

ARNm : ARN messenger

ChIP : immunoprécipitation de la chromatine

ChIP-chip : technique couplant l'immunoprécipitation de la chromatine aux puces à ADN

ChIP-qPCR : technique couplant l'immunoprécipitation de la chromatine au qPCR

CPI : complexe de préinitiation

g : unité d'accélération

g : gramme

kb : kilobase

kDa : kilodalton

ARN Pol II : ARN polymérase II

LM-PCR : Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction

Mécanisme d'incorporation d'histones CR : mécanisme couplé à la réplication

Mécanisme IR : indépendant de la réplication

Milieu YNB : Yeast Nitrogen Base

Milieu YNB –Trp : milieu YNB ne contenant pas de tryptophane

MNase : nucléase micrococcale

MNase-chip : technique couplant la digestion de l'ADN par la MNase aux puces à ADN

nt : nucléotide

NFR : Nucleosome Free Region (région sans nucléosome)

Oligo : oligonucléotide

ORF : Open Reading Frame (cadre de lecture ouvert)

pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

pSer-2 ou pSer-5 : Acide aminé Ser-2 ou Ser-5 phosphorylé.

qPCR : PCR quantitatif en temps réel

Ser-2 ou Ser-5 : Acide aminé sérine en position 2 ou 5 de l'heptapeptide répété du CTD

TSS : Transcription Start Site (site d'initiation de la transcription)

U : unité enzymatique

Remerciements

Je remercie tous ceux et celles qui ont participé à la réalisation de mon projet de recherche ainsi qu'à l'écriture de ce mémoire. Cela inclut mon directeur de recherche (François Robert), les membres de mon laboratoire (Alain Roger Bataille, Simon Drouin, Audrey Forest, Marie-Ève Fortin, Sara Hardy, Pierre-Étienne Jacques, Josette-Renée Landry et Louise Laramée) ainsi que Luc Gaudreau et Marc Larochelle de l'Université de Sherbrooke, et Corey Nislow de l'Université de Toronto, avec qui nous avons collaboré pour le projet de positionnement des nucléosomes. Je remercie également Bernard Turcotte de l'Université McGill, qui m'a fourni d'importants conseils sur les systèmes d'induction et de répression des gènes chez la levure.

Je souligne particulièrement le travail significatif de Pierre-Étienne Jacques dans l'analyse des données et pour ses suggestions concernant le projet de recherche. Enfin, je remercie spécialement Alain Roger Bataille, Simon Drouin et Louise Laramée pour leur support moral et technique.

1. Introduction

Le présent ouvrage décrit les résultats de mes recherches sur la transcription et la structure de la chromatine effectuées chez la levure *S. cerevisiae*. Mon projet de recherche a été divisé en deux volets dont les buts spécifiques sont distincts. Le premier porte sur la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II en cours de transcription et le deuxième s'intéresse au rôle que joue la variante d'histone H2A.Z dans la transcription. Les deux projets sont toutefois similaires de par l'approche génomique utilisée, laquelle consiste à étudier l'information génétique dans son ensemble plutôt que des gènes candidats précis. Les deux projets peuvent être également reliés par un but général commun : mieux comprendre l'expression des gènes eucaryotes.

1.1 Localisation génomique des isoformes phosphorylées de l'ARN polymérase II

Les gènes eucaryotes sont transcrits par des complexes protéiques composés de plusieurs sous-unités. De par leur taille gigantesque, ces complexes constituent de véritables machines transcriptionnelles. Les gènes regroupés au sein d'une même classe possèdent une machinerie qui leur est propre. Ainsi, les gènes codant pour les protéines, appartenant à la classe II, sont transcrits par l'ARN polymérase II en association avec une vaste gamme de protéines, incluant les facteurs généraux de transcription (Roeder, 1991).

De façon générale, la transcription peut être divisée en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Une étape additionnelle précède l'initiation : le recrutement au promoteur et l'assemblage des protéines nécessaires à la transcription. Le complexe de préinitiation (CPI) désigne la machinerie complètement assemblée et prête à transcrire. L'étape d'assemblage du CPI diffère entre les eucaryotes unicellulaires et les eucaryotes supérieurs. Chez les mammifères, la machinerie transcriptionnelle est souvent maintenue en état de pause au promoteur. L'assemblage du CPI peut se faire longtemps avant la transcription du gène. Ainsi, l'ARN Pol II est prête à transcrire le gène, mais requiert des événements de signalisation pour débiter la transcription. De façon opposée, le recrutement du CPI chez la levure se fait immédiatement avant la transcription et il n'existe aucune

évidence du mécanisme de pause au promoteur retrouvé chez les mammifères (Core and Lis, 2008).

Chez les eucaryotes, la traduction survient dans le cytoplasme et n'est donc pas couplée à la transcription. Cette séparation temporelle et spatiale permet au transcrit primaire de subir diverses modifications avant d'être exporté vers le cytoplasme pour être traduit. Les principales modifications de l'ARNm sont l'ajout d'une coiffe en 5', l'épissage des introns et le clivage et la polyadénylation de l'extrémité 3'. Au moment de leur découverte, ces modifications ont été considérées comme des événements distincts, mais des recherches ont mis en évidence leur interrelation. On a en effet observé une synergie entre ces événements. Par exemple, l'ajout de la coiffe peut avoir des effets positifs sur l'épissage et la polyadénylation (Hirose and Manley, 2000). De plus, ces modifications de l'ARNm sont couplées à la transcription. Ainsi, l'ajout de la coiffe se fait après la transcription de 20-30 nt d'ARNm, l'épissage se fait au fur et à mesure que les introns sont transcrits et le clivage et la polyadénylation en 3' de l'ARNm précède la terminaison de la transcription par l'ARN pol II (Proudfoot et al., 2002). Ces découvertes suscitent des questions sur les mécanismes moléculaires permettant d'associer ces événements. Comment les protéines effectrices de la modification de l'ARNm interagissent-elles avec l'ARN pol II? Quels signaux permettent aux modifications d'être effectuées au bon moment lors de la transcription? La réponse à ces questions nécessite une description approfondie de la composition de l'ARN polymérase II.

L'ARN Pol II de levure est composée de 12 sous-unités dont la plus massive, Rpb1, possède un domaine C-terminal (CTD) particulier. Ce CTD est constitué d'une répétition d'une séquence peptidique conservée, dont le consensus est Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7. Variable d'une espèce à l'autre, le nombre de répétitions est d'environ 26 chez la levure. Dans cette séquence peptidique, cinq résidus sur sept sont phosphorylables, mais la phosphorylation des sérines aux positions 2 et 5 joue un rôle particulièrement important pour la transcription (Hirose and Ohkuma, 2007).

Dans les années 1990, des études de mobilité électrophorétique ont permis d'identifier deux principales isoformes de l'ARN Pol II. La forme Pol IIA, possédant un CTD hypophosphorylé, est la forme principale retrouvée dans la fraction soluble des extraits

nucléaires et elle n'effectue pas la transcription (Corden, 1990). La polymérase en cours de transcription possède un CTD hyperphosphorylé et est désignée Pol II_O (Wuarin and Schibler, 1994). Des expériences subséquentes ont mis au jour un patron de phosphorylation du CTD plus détaillé, se produisant en deux étapes principales. La phosphorylation des Ser-5, qui atteint son maximum lors de l'initiation de la transcription, précède celle des Ser-2, qui débute lors de l'élongation (Phatnani and Greenleaf, 2006). À ce jour, on a découvert quatre kinases et une phosphatase du CTD chez la levure. Lors de l'initiation, les Ser-5 sont phosphorylées par la sous-unité Kin28 du facteur TFIIF qui entre dans la composition de la machinerie transcriptionnelle (Feaver et al., 1994). La kinase CTDK-1 phosphoryle ensuite les Ser-2. La phosphatase Fcp1 permettrait de déphosphoryler les Ser-2 pour régénérer l'enzyme hypophosphorylée capable d'être recrutée au promoteur. La kinase Srb10/Srb11 régulerait la transcription de façon négative en phosphorylant le CTD avant la formation du CPI. Enfin, la kinase Bur1/Bur2 est moins comprise, mais elle jouerait un rôle dans la régulation de la transcription par les activateurs transcriptionnels (Cho et al., 2001).

Des expériences ont démontré que le CTD sert, entre autres, à recruter les protéines nécessaires à la modification de l'ARNm en cours de transcription. Par exemple, l'enzyme responsable de l'ajout de la coiffe en 5' de l'ARNm, constituée des sous-unités Cet1 et Ceg1 chez la levure, interagit avec le CTD (Cho et al., 1997). De façon cohérente, des cellules de mammifères possédant un CTD tronqué subissent un défaut d'ajout de la coiffe sur leurs ARNm transcrits par l'ARN Pol II (McCracken et al., 1997). Dans ce contexte, la phosphorylation du CTD amène une information supplémentaire permettant de contrôler le recrutement des protéines. Certains facteurs de modification de l'ARNm ne reconnaissent qu'une forme phosphorylée du CTD. Par exemple, l'enzyme Cet1/Ceg1 n'est recrutée que par le CTD phosphorylé en Ser-5 et non pas le CTD hypophosphorylé (Cho et al., 1997). Puisque l'état de phosphorylation du CTD est modifié à chacune des principales étapes de la transcription, cela permet de contrôler le recrutement d'effecteurs de façon temporelle, et de bien coordonner les modifications de l'ARNm et la transcription.

Il est à noter que des processus autres que la modification de l'ARNm dépendent aussi de la phosphorylation du CTD. Premièrement, la progression de l'ARN pol II le long du gène est elle-même régulée par l'action opposée des kinases et phosphatases du CTD. Le départ de

la polymérase du promoteur est rendu possible par la phosphorylation des Ser-5 par la kinase Kin28 de TFIIH. Cette phosphorylation aide l'ARN Pol II à se défaire de son interaction avec le médiateur, un complexe protéique retrouvé dans le complexe de pré-initiation, mais absent de la machinerie transcriptionnelle en cours d'élongation. On a en effet observé que seule la polymérase possédant un CTD hypophosphorylé est capable d'interagir avec le médiateur (Davis et al., 2002), et donc que seule cette isoforme est susceptible d'être retenue au promoteur. L'élongation est aussi régulée par les actions antagonistes de CTDK-1 et Fcp1. CTDK-1 phosphoryle la Ser-2 pour favoriser l'élongation, alors que Fcp1 déphosphoryle ce même résidu pour y mettre un frein (Cho et al., 2001). Deuxièmement, la phosphorylation du CTD est requise pour le recrutement de deux méthylases d'histones, Set1 et Set2. Set1 est recrutée par le CTD phosphorylé en Ser-5 (Ng et al., 2003). La modification qu'elle impose aux histones H3, la tri-méthylation des lysines 4 (*H3K4 tri-methylation*), est située en 5' du gène. À l'opposé, Set2 est recrutée par le CTD phosphorylé en Ser-2 et entraîne la méthylation des lysines 36 (*H3K36 methylation*) (Krogan et al., 2003). Puisque la méthylation de ces résidus est une marque d'histone stable et qu'elle est associée à l'euchromatine, on croit que le rôle de Set1 et Set2 est de faciliter la récurrence de la transcription au gène marqué (Hampsey and Reinberg, 2003).

Le modèle de phosphorylation du CTD décrit plus haut a été élaboré à partir d'expériences où la localisation de l'ARN Pol II et de ses formes phosphorylées a été déterminée le long de quelques gènes, grâce à la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) (voir la section *Matériel et méthodes*). Chez la levure, ces gènes incluent *ADHI*, *PMA1*, *PYK1* (Ahn et al., 2004), *ACT1*, *ENO2*, *TEF1*, *GAL1*, *GAL10* (Schroeder et al., 2000), *GSY2* et *GAL4* (Xiao et al., 2003). Concernant les eucaryotes supérieurs, les gènes *hsp70*, *hsp26*, *Tub*, *GAP*, *Actin5C* et *H1* ont été étudiés chez la drosophile (Boehm et al., 2003) et les gènes *PPIA*, *GAPDH*, *NKX3-1*, *PSA*, *MAF*, *ELL2* et *FKBP5* ont été étudiés chez l'humain (Morris et al., 2005). Même si la quantité de données générées a été suffisante pour dresser un modèle de la phosphorylation qui survient généralement lors de la transcription, la plupart des gènes cités ont été étudiés à faible résolution, parfois en ne scrutant que deux régions du gène : les portions 5' et 3'.

Objectif no. 1

Chez les eucaryotes supérieurs, le modèle de la phosphorylation du CTD décrit plus haut est débattu, puisque des résultats comme la présence ou l'absence de phosphorylation de Ser-2 au promoteur s'avèrent différents selon les études (Boehm et al., 2003; Cheng and Sharp, 2003; Morris et al., 2005). Chez la levure, par contre, les résultats sont similaires pour tous les gènes étudiés, mais l'extrapolation du modèle classique à l'ensemble des gènes reste une hypothèse. Seule l'étude du génome complet de *S. cerevisiae* permettrait de déterminer si le modèle classique de phosphorylation est essentiel à la transcription, ou si des exceptions existent. Un mécanisme alternatif pourrait être utilisé pour la transcription de certains gènes. Aussi, certaines étapes de la phosphorylation pourraient devenir facultatives. Par exemple, l'ajout de la coiffe par une enzyme différente de Cet1/Ceg1 pourrait éliminer le besoin de la phosphorylation en Ser-5. Pour appuyer l'hypothèse de ces différences, il a été démontré *in vitro* que la transcription est réalisable en l'absence de toute phosphorylation du CTD (Serizawa et al., 1993). De plus, la localisation des états de phosphorylation de l'ARN Pol II à l'échelle génomique fournirait une banque de données pertinente pour de futurs projets de recherches impliquant la phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II. Par exemple, l'étude de la méthylation des histones à certains gènes pourrait être facilitée par la connaissance du patron de phosphorylation du CTD à ces loci, puisque cette phosphorylation influence le recrutement d'enzymes de modification de la chromatine comme Set2 (Krogan et al., 2003). Mon premier objectif est donc de déterminer le patron de phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II pour tous les gènes de *S. cerevisiae*.

1.2 Étude fonctionnelle de la variante d'histone H2A.Z

L'ensemble de l'information génétique d'un organisme constitue son génome et est contenu dans une ou plusieurs molécules d'ADN. *In vivo*, l'ADN est associé à une multitude de protéines. Chez les eucaryotes, cet enchevêtrement d'ADN et de protéines est appelé « chromatine ». Le fait de maintenir son ADN dans la chromatine confère deux avantages principaux à la cellule : la compaction du matériel génétique et la régulation de l'expression génétique.

En comparaison aux procaryotes, les génomes eucaryotes sont de très grandes tailles. Par ailleurs, les noyaux cellulaires de ces organismes sont de petites dimensions, ce qui amène

la nécessité de compacter l'ADN suffisamment pour qu'il puisse être contenu dans ces noyaux. Pour y parvenir, la cellule maintient son ADN en association avec les protéines de la chromatine, ce qui permet une compaction du matériel génétique de plusieurs milliers de fois.

Les protéines principales de la chromatine sont les histones. Ces petites protéines globulaires s'assemblent entre elles par groupe de huit pour former des octamères d'histones autour desquels l'ADN est enroulé. Chaque particule formée d'un octamère d'histones et de son ADN constitue un nucléosome. Dans certaines conditions, les nucléosomes sont eux-mêmes compactés dans des structures d'ordres supérieurs. Le degré de compaction ultime est atteint lorsque l'ADN est maintenu sous forme de chromosomes mitotiques pendant la division cellulaire.

En modifiant le degré de compaction, la cellule parvient à contrôler le taux de transcription de ses gènes. En effet, les nucléosomes sont généralement des structures limitant la transcription. Ils constituent un obstacle physique au passage de l'ARN polymérase et masquent également des sites de liaisons essentiels pour des facteurs de transcription (Henikoff and Ahmad, 2005). La décompaction de l'ADN permet de faciliter le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et son passage subséquent le long du gène transcrit.

La structure détaillée des nucléosomes révèle qu'ils sont composés d'en moyenne 146 pb d'ADN enroulé autour d'un octamère, lui-même formé de deux copies de chaque type d'histones (H2A, H2B, H3 et H4) assemblées de façon structurée : un tétramère (H3-H4)₂ est associé à deux dimères H2A-H2B (Luger et al., 1997). Les histones peuvent être divisées en trois parties : 1) la portion C-terminale, 2) la portion centrale, dont le repliement tridimensionnel appelé *histone fold* est caractéristique des histones et est conservé entre elles, et 3) la portion N-terminale. La queue N-terminale contient un nombre significatif d'acides aminés basiques, chargés positivement au pH physiologique. Ces charges permettent une interaction forte avec l'ADN qui est chargé négativement. De plus, des modifications covalentes des acides aminés N-terminaux des histones permettent de modifier la charge de ces résidus. Par exemple, l'ajout de groupements acétyle aux lysines permet de masquer leur charge positive, diminuant la force d'interaction du nucléosome

avec l'ADN (Shia et al., 2006). La modification covalente des histones constitue donc un moyen de contrôler la compaction de certaines régions d'ADN.

Un second mécanisme est le remodelage de la chromatine. Des complexes protéiques possédant une activité ATPase sont capables de déplacer les nucléosomes (Becker and Horz, 2002). L'hydrolyse d'ATP fournit l'énergie nécessaire pour diminuer la force d'interaction entre les histones et l'ADN. Le déplacement de nucléosomes permet, à l'instar des modifications covalentes, de rendre disponibles des sites de liaisons pour des facteurs de transcription, mais une multitude d'autres mécanismes existent comme le couplage entre le remodelage et les modifications covalentes de la chromatine. Par exemple, le recrutement du complexe SWI/SNF au promoteur du gène PSA humain résulte en la dissociation de l'acétyltransférase p300. La perte de groupements acétyle au promoteur est alors responsable de la répression du gène PSA (Dai et al., 2008).

Un troisième mécanisme est l'utilisation de variantes d'histones possédant des fonctions particulières. Ces variantes peuvent être incorporées dans les nucléosomes et contribuer à créer des régions chromosomiques possédant des caractéristiques différentes. Plusieurs variantes ont été découvertes chez les eucaryotes supérieurs. Par exemple, H2A.Z, H2A.Bbd, H2A.X et MacroH2A sont des variantes de H2A, alors que H3.3 et CENP-A sont des variantes de H3 (Ausio et al., 2001). Certaines de ces variantes sont impliquées dans des processus autres que la régulation de la transcription. H2A.X joue un rôle dans la réparation des bris d'ADN double brin. CENP-A, désignée Cse4p chez la levure, est localisé aux centromères et est impliqué dans la ségrégation des chromosomes (Smith, 2002).

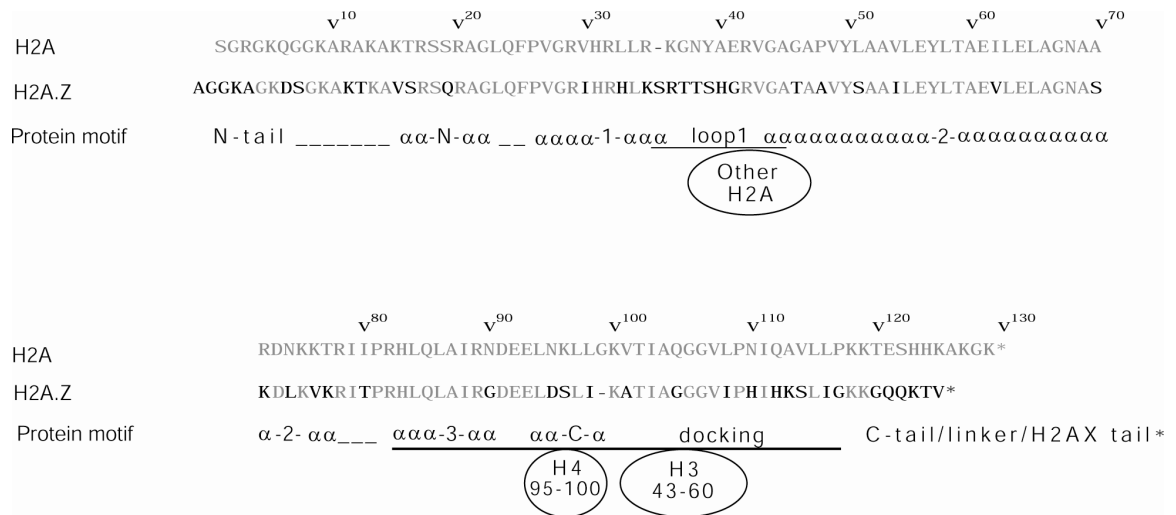


Figure 1. Alignement des séquences protéiques des histones H2A et H2A.Z humaines.
Adaptation de (Redon et al., 2002).

Chez la levure, H2A.Z (gène *HTZI*) est la variante d'histone la plus étudiée. L'alignement des séquences de H2A et H2A.Z montre la ressemblance des deux histones (Fig. 1). La majorité des différences d'acides aminés réside dans la partie C-terminale et dans la boucle L1, essentielle pour la liaison du tétramère (H3-H4)₂ (Redon et al., 2002). H2A.Z n'est pas une simple variante allélique de H2A. Elle possède des fonctions différentes, dont certaines seraient dues à la séquence d'acides aminés particulière de sa portion C-terminale (Clarkson et al., 1999). Parmi ces fonctions, mentionnons la capacité de recruter l'ARN polymérase II à certains gènes (Adam et al., 2001). De plus, elle est extrêmement conservée de la levure à l'humain. Il existe une plus grande similitude entre les histones H2A.Z d'organismes évolutivement éloignés qu'entre les histones H2A et H2A.Z d'un même organisme (Santisteban et al., 2000). Cette très grande conservation suggère un rôle essentiel pour H2A.Z, ce qui est cohérent avec le fait qu'elle est essentielle à la viabilité de *Tetrahymena thermophila*, de la Drosophile et de la souris (Faast et al., 2001; Liu et al., 1996; Ridgway et al., 2004), sans toutefois être requise pour la survie de *S. cerevisiae* (Dhillon and Kamakaka, 2000).

De façon intéressante, H2A.Z jouerait un rôle dans la ségrégation des chromosomes. Chez *S. cerevisiae*, il a été démontré que H2A.Z interagit génétiquement avec des composantes des kinétochores en plus d'être recruté aux centromères (Krogan et al., 2004). De plus, la délétion d'un groupe de protéines dont H2A.Z fait partie accroît la fréquence de pertes

chromosomiques. Ces résultats suggèrent l'implication de H2A.Z dans la ségrégation des chromosomes, ce qui corrobore des études faites chez *S. pombe* (Carr et al., 1994) et les mammifères (Rangasamy et al., 2004).

Cependant, la fonction de H2A.Z la plus étudiée est la régulation de l'expression génétique. Il a été démontré que H2A.Z peut accroître ou diminuer l'expression des gènes, par divers mécanismes. L'histone jouerait un rôle pour prévenir le *silencing* des gènes situés près des télomères (Meneghini et al., 2003). Elle empêcherait la propagation de l'hétérochromatine exercée par Sir2. En effet, la délétion de H2A.Z entraîne un défaut d'expression de ces gènes, qui peut toutefois être annulé par la délétion de Sir2. Les gènes dont l'expression est ainsi protégée par H2A.Z sont regroupés sous le nom de domaines HZAD (pour *H2A.Z Activated Domains*). H2A.Z serait aussi impliquée dans la formation de l'hétérochromatine. Elle serait nécessaire pour la condensation de la chromatine aux centromères chez la Drosophile, par un mécanisme impliquant son recrutement à la région cible, l'acétylation des histones H3 et H4 et le recrutement de HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) (Swaminathan et al., 2005). Chez la levure, H2A.Z participerait au *silencing* du locus HMR, en favorisant l'action du complexe Sir. La surexpression de H2A.Z permet de rétablir le *silencing* du HMR dans un mutant où la protéine Sir1 est incapable d'exercer sa fonction de *silencing* (Dhillon and Kamakaka, 2000). Selon le modèle proposé, H2A.Z serait incorporé dans les nucléosomes au locus HMR et y augmenterait la stabilité du complexe Sir.

En plus de réguler l'expression des gènes de façon globale en favorisant la formation de l'euchromatine et l'hétérochromatine, H2A.Z exercerait son action dans des régions plus discrètes et contribuerait à modifier la structure de la chromatine de façon plus fine. H2A.Z a été localisé majoritairement aux promoteurs des gènes (Guillemette et al., 2005; Raisner et al., 2005). 74% des nucléosomes contenant H2A.Z sont localisés dans 63% des promoteurs du génome. Guillemette et al. ont découvert que dans chaque promoteur concerné, deux nucléosomes portant H2A.Z sont situés en aval d'une région d'environ 150 pb située à environ 200 pb du codon d'initiation qui est dénudée de nucléosome et que l'on désigne *Nucleosome Free Region* (NFR) (Yuan et al., 2005). Cette localisation est actuellement débattue puisqu'on a aussi observé la localisation des nucléosomes portant H2A.Z non pas en aval du NFR, mais de part et d'autre de cette région (Raisner et al.,

2005). La présence de l'histone au promoteur serait absolument ou partiellement nécessaire à l'expression correcte de certains gènes. Par exemple, la double délétion *htz1Δ snf2Δ* affecte la condensation de la chromatine au promoteur du gène *PHO5* et empêche son induction correcte lors d'une carence en phosphore inorganique (Santisteban et al., 2000). La voie métabolique du galactose a également été étudiée. La délétion *htz1Δ* diminue significativement l'induction des gènes *GAL1*, *GAL7* et *GAL10* par le galactose (Adam et al., 2001). Adam et al. ont démontré que H2A.Z interagit avec la sous-unité Rpb1 de l'ARN polymérase II *in vitro*, et que Rpb1 et la Tata-box Binding Protein (TBP) ne peuvent être recrutés correctement au promoteur de *GAL1* dans un mutant *htz1Δ* en présence de galactose. Ces résultats montrent l'implication du recrutement de l'ARN polymérase II dans le mécanisme permettant à H2A.Z de moduler la transcription, mais ne remettent pas en doute le modèle du remodelage de la chromatine, puisqu'une altération de la structure nucléosomale pourrait être la cause d'un défaut de recrutement de la machinerie transcriptionnelle.

1.2.1 Les modèles possibles de la régulation transcriptionnelle par H2A.Z

Il est important de mentionner que la variante H2A.Z n'est pas localisée de façon statique aux promoteurs. Santisteban et al. ont observé une déplétion de H2A.Z aux promoteurs de *PHO5* et *GAL1* suite à leur induction (Santisteban et al., 2000). Adam et al. ont observé des résultats similaires aux gènes *GAL1* et *GAL10* (Adam et al., 2001). Ces résultats sont cohérents avec la découverte qu'il existe une corrélation inverse entre le niveau de transcription et la présence de H2A.Z au promoteur. En d'autres termes, les promoteurs des gènes hautement transcrits possèdent peu ou pas d'histone H2A.Z, et cela pourrait être dû à la déplétion en nucléosomes qui survient dans les promoteurs des gènes très transcrits (Boeger et al., 2003; Boeger et al., 2004; Kristjuhan and Svejstrup, 2004; Lee et al., 2004; Reinke and Horz, 2003; Schwabish and Struhl, 2004; Yuan et al., 2005). Il est possible que H2A.Z soit déposée aux promoteurs des gènes inactifs, qu'elle contribue à rendre ces gènes transcritibles, et que n'étant plus nécessaire, elle soit éjectée dans une étape précédant la transcription. Alternativement, cette éjection pourrait être requise pour l'activation du gène. Dans les prochaines lignes, je discuterai de ces deux possibilités en décrivant les deux principaux modèles hypothétiques de la régulation de la transcription par H2A.Z.

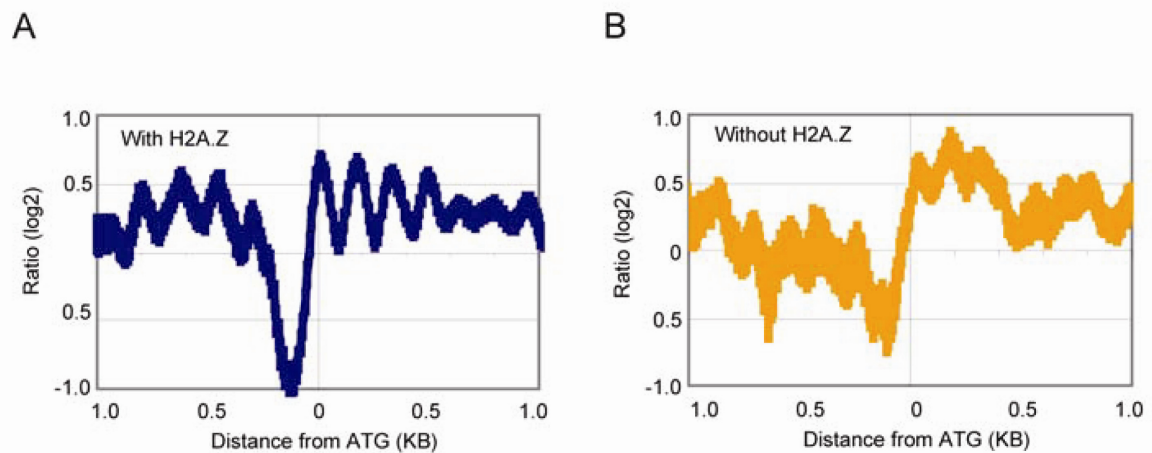


Figure 2. Alignement des nucléosomes sur le codon d'initiation dans deux groupes de promoteurs. A) Les promoteurs contenant H2A.Z semblent posséder des nucléosomes bien positionnés. B) Les promoteurs ne contenant pas H2A.Z montrent une courbe d'alignement moins définie, ce qui peut être dû à une mobilité accrue des nucléosomes et/ou l'absence de consensus dans leur positionnement. Adaptation de la figure originale de Guillemette et al., 2005, générée à partir de données de MNase-chip. L'axe des y représente l'enrichissement des séquences nucléosomales protégées contre la digestion à la MNase (voir la section des résultats pour plus d'explications). L'axe des x représente la position génomique étudiée, exprimée par la distance au codon d'initiation (ATG).

Positionnement des nucléosomes

La première hypothèse est que H2A.Z aiderait à structurer la position des nucléosomes du promoteur de façon à permettre ou faciliter le recrutement de facteurs de transcription et/ou de composantes de la machinerie transcriptionnelle.

La première évidence suggérant ce modèle provient de la comparaison des positions nucléosomales dans les promoteurs contenant H2A.Z et ceux ne le contenant pas (Guillemette et al., 2005). Dans chacun des deux groupes, on a déterminé la position moyenne des nucléosomes par rapport au codon d'initiation. Les nucléosomes des promoteurs contenant H2A.Z semblent alignés uniformément, alors que les nucléosomes des promoteurs ne contenant pas H2A.Z semblent distribués de façon différente pour chaque promoteur (Fig. 2). De façon alternative, la courbe moins bien définie du second groupe pourrait témoigner de la mobilité accrue des nucléosomes. Tel qu'expliqué précédemment, l'absence de H2A.Z aux promoteurs du second groupe peut être causée par la forte transcription de ces gènes. La déstructuration des nucléosomes observée à ces

promoteurs pourrait donc être due à leur fort niveau de transcription. Rappelons que le passage de l'ARN polymérase le long de l'ADN entraîne une certaine éjection des nucléosomes qui s'y trouvent. Pour s'en assurer, les auteurs ont analysé le niveau de transcription des gènes du second groupe (sans H2A.Z), et aucune différence significative du niveau de transcription n'a été observée en comparaison au premier groupe, indiquant que l'absence de H2A.Z au promoteur de ces gènes n'était pas due à un niveau de transcription plus élevé (communication personnelle). La comparaison de la position des nucléosomes a été effectuée à partir des données publiées par Yuan et al., où les nucléosomes ont été localisés sur une portion du génome de 482 kb, incluant la presque totalité du chromosome III (Yuan et al., 2005). Bien que l'octamère d'histones ne devrait pas avoir de spécificité particulière pour des séquences d'ADN, les auteurs ont été surpris de constater que 65 à 69% des nucléosomes occupent des positions définies, par opposition aux nucléosomes qui occupent des positions variables et que l'on décrit comme des nucléosomes mobiles. Les nucléosomes fixement positionnés sont rencontrés surtout aux promoteurs, près du NFR.

Une deuxième évidence est l'observation d'un déplacement de 10 pb d'un nucléosome du promoteur de *GAL1* dans un mutant *htz1Δ* (Guillemette et al., 2005). La position de deux nucléosomes situés de part et d'autre de la boîte TATA a été déterminée à haute résolution dans une souche sauvage et le mutant. Il s'est avéré que le déplacement est spécifique au nucléosome en aval de la boîte TATA. Cette expérience a été réalisée dans des conditions où le gène *GAL1* n'est pas induit. Malgré tout, il est possible que ce déplacement d'un nucléosome soit responsable du défaut d'induction de *GAL1* en présence de galactose. Le positionnement correct du nucléosome pourrait être requis avant l'étape d'induction.

Stabilité des nucléosomes

Dans le deuxième modèle, H2A.Z déstabiliserait certains nucléosomes du promoteur pour faciliter le remodelage de la chromatine et rendre disponibles des séquences d'ADN essentielles au recrutement de facteurs protéiques. Des études structurales par diffraction des rayons X ont suggéré que le nucléosome contenant H2A.Z est moins stable que celui contenant H2A (Luger et al., 1997; Suto et al., 2000). Même si la force d'interaction entre les deux histones H2A.Z semble accrue par rapport aux deux H2A, la stabilité globale serait inférieure en raison d'une déstabilisation de l'interaction entre le dimère H2A.Z-H2B et le tétramère (H3-H4)₂. Une étude où l'interaction entre le dimère et le tétramère a été

observée dans des conditions croissantes de force ionique a révélé que le dimère H2A.Z-H2B est éjecté du nucléosome à une force ionique plus élevée que le dimère H2A-H2B, indiquant une plus grande stabilité du nucléosome contenant H2A.Z (Park et al., 2004). Malgré cela, il est généralement accepté que H2A.Z déstabilise le nucléosome. Par une technique couplant le lavage de la chromatine par des solutions de différentes forces ioniques et le *Western blot*, Zhang et al. ont observé que H2A.Z disparaît de la chromatine à plus faible force ionique que H2A (Zhang et al., 2005). Même si ce résultat ne prouve pas que le nucléosome contenant H2A.Z est éjecté de la chromatine *in vivo*, ces données laissent croire que la déposition de H2A.Z aux promoteurs rendrait plus facile le désassemblage des nucléosomes et le remodelage de la chromatine.

Objectif no. 2

Les deux modèles présentés ne sont pas mutuellement exclusifs au sein de la cellule. Il se peut que le positionnement des nucléosomes prévale pour certains gènes et que la déstabilisation soit utile ailleurs dans le génome. Il n'est pas non plus exclu que ces deux modèles se complémentent au sein d'un même promoteur. Pour mieux comprendre le mode d'action de H2A.Z dans la modulation de la transcription, j'ai choisi de me concentrer sur l'étude du premier modèle. Pour déterminer si H2A.Z altère la structure de la chromatine ailleurs qu'au gène *GAL1* (Guillemette et al., 2005), j'ai localisé les nucléosomes à l'échelle génomique dans une souche sauvage de *S. cerevisiae* et un mutant *htz1Δ*. Je voulais ainsi détecter si la délétion de H2A.Z causerait des déplacements ou des pertes de nucléosomes, ou encore une variation dans leur mobilité.

1.2.2 Dynamique d'incorporation de H2A.Z dans la chromatine

Les histones, qu'il s'agisse des formes canoniques ou des variantes, doivent être incorporées dans la chromatine pour exercer leur rôle. La chromatine étant une structure dynamique, les mécanismes permettant l'incorporation des nucléosomes sont grandement sollicités, et ce, à différentes étapes du cycle cellulaire. L'événement le plus évident est sans doute la réplication de l'ADN, en vue de la division cellulaire. L'ADN nouvellement synthétisé ne contient pas de nucléosomes. Les nucléosomes canoniques doivent être incorporés pour respecter le besoin essentiel de compacter l'ADN. Ceux-ci sont incorporés par un mécanisme couplé à la réplication (CR), dont je décrirai les principales étapes.

Durant la réplication, les nucléosomes qui appartenaient au duplexe d'ADN « mère » sont distribués aléatoirement entre les deux copies filles, générant ainsi deux copies également mais insuffisamment pourvues de nucléosomes. Pour combler ce manque, la synthèse *de novo* d'histones canoniques survient en phase S. Celles-ci sont d'abord acétylées avant d'être incorporées par des complexes agissant spécifiquement dans le mécanisme CR. Les principaux sont les complexes CAF-I (Smith and Stillman, 1989), RCAF (Tyler et al., 1999) et NAP1 (Ishimi et al., 1984), mais plusieurs autres complexes ont été découverts (Haushalter and Kadonaga, 2003). Ces histones sont désacétylées suite à leur incorporation (Verreault, 2000).

D'autres événements entraînent une perte de nucléosomes et nécessitent des mécanismes d'incorporation indépendants de la réplication (IR). Mentionnons par exemple le passage de l'ARN polymérase durant la transcription, la dégradation et la synthèse *de novo* d'ADN pour la réparation, ou encore la recombinaison (Ahmad and Henikoff, 2002). L'utilisation de plusieurs mécanismes d'incorporation permet également de réguler le marquage épigénétique de l'ADN. Chaque complexe d'assemblage pourrait recruter des enzymes de modification de la chromatine spécifiques. Par exemple, l'interaction physique entre CAF-I et la protéine HP1 a été démontrée, et cela permettrait d'établir des zones d'hétérochromatine dans l'ADN nouvellement répliqué (Quivy et al., 2004).

Les histones incorporées de façon indépendante de la réplication incluent les variantes que j'ai décrites précédemment. La synthèse et l'incorporation de ces variantes montre des différences importantes en comparaison aux histones canoniques. Les variantes, plutôt que d'être produites spécifiquement en phase S, sont synthétisées durant tout le cycle cellulaire. Leur incorporation n'est pas limitée à la phase S, comme dans le cas de l'histone H3.3 qui peut être incorporée en tout temps (Ahmad and Henikoff, 2002). Cela ne signifie pas que toutes les variantes sont synthétisées et incorporées de façon constante durant la vie de la cellule. À titre d'exemple, l'histone CENP-A doit être exprimée au milieu de la phase S, sans quoi elle ne peut pas être insérée dans la chromatine (Shelby et al., 1997). Bref, chaque histone possède ses caractéristiques propres, déterminées par sa fonction.

Des recherches effectuées par trois laboratoires indépendants ont permis d'identifier le complexe responsable de l'incorporation de H2A.Z. Ce complexe, d'abord identifié par le

groupe Greenblatt, est désigné « SWR-C » (Krogan et al., 2003). Il est composé de 13 sous-unités dont Swr1, une ATPase de la famille des remodeleurs de chromatine Snf2, est la plus massive et la plus importante. Des expériences d'interactions génétiques ont suggéré un lien entre certaines sous-unités de SWR-C et H2A.Z. De plus, SWR-C et H2A.Z interagissent physiquement *in vivo*. D'un point de vue fonctionnel, la délétion de Swr1 diminue l'expression de gènes dont l'expression est aussi diminuée par la délétion de H2A.Z, suggérant que le complexe SWR-C participe aux fonctions de l'histone. Cependant, la véritable démonstration que SWR-C sert à recruter H2A.Z sur l'ADN a été faite par immunoprécipitation de H2A.Z dans différents mutants de SWR-C. La délétion des sous-unités Swr1, Swc2, Swc3, Swc6 et Arp6 diminue ou abolit le recrutement de H2A.Z au promoteur des gènes *ADH1*, *PMA1*, *GAL1*. Des résultats similaires ont été obtenus par le groupe Wu (Mizuguchi et al., 2004) et le groupe Rine (Kobor et al., 2004). Cependant, Mizuguchi et al. ont apporté une information importante concernant le mécanisme d'incorporation. Une expérience où des nucléosomes immobilisés sur des billes ont été mis en présence du complexe SWR-C et d'ATP a suggéré que le complexe échange les dimères H2A-H2B pour des dimères H2A.Z-H2B. Selon le modèle proposé par les auteurs, le complexe SWR-C utiliserait son activité de remodeleur de chromatine pour briser l'interaction entre l'ADN et les histones aux points d'entrée et de sortie du nucléosome. Ce faisant, les dimères H2A-H2B seraient détachés de l'octamère et seraient remplacés par les dimères H2A.Z-H2B contenus dans le complexe SWR-C. Enfin, le complexe réassemblerait le nucléosome grâce à son activité ATPase. Ces résultats impliquent que les nucléosomes canoniques sont d'abord assemblés par défaut aux futurs emplacements des nucléosomes contenant H2A.Z. Cela montre une fois de plus la nature dynamique de la chromatine.

Pour vérifier si le complexe SWR-C est absolument essentiel pour l'incorporation de H2A.Z, ou si l'incorporation à certains loci est indépendante de SWR-C, Zhang et al. ont vérifié l'emplacement de H2A.Z portant l'étiquette HA (H2A.Z-HA) dans le génome entier de *S. cerevisiae* dans un mutant *swr1Δ* (Zhang et al., 2005). Il semble que SWR-C est requis pour le remplacement de H2A par H2A.Z, puisque les résultats obtenus pour le mutant *swr1Δ* et le contrôle (H2A.Z sans étiquette HA) sont indiscernables.

Si le mécanisme d'incorporation de H2A.Z est en voie d'être élucidé, nous ignorons à quel(s) moment(s) du cycle cellulaire cet événement se produit. Des niveaux significatifs de transcription du gène *HTZI* sont détectables durant tout le cycle cellulaire, mais l'expression de H2A.Z atteint un maximum au début de la phase G2 (Spellman et al., 1998). L'incorporation pourrait avoir lieu à n'importe quelle étape du cycle cellulaire, mais il est probable qu'elle survienne peu de temps après la synthèse de l'histone. Il est également possible que le moment soit différent pour chaque gène, ou que l'incorporation soit indépendante du cycle cellulaire. L'état d'activation ou de répression du gène pourrait être le paramètre contrôlant l'incorporation de H2A.Z à son promoteur. En lien avec l'hypothèse selon laquelle H2A.Z servirait à préparer le gène pour une éventuelle activation, il est probable que l'incorporation de H2A.Z se fasse immédiatement après la répression du gène (Henikoff and Ahmad, 2005). La réutilisation future de l'information des gènes mis sous silence serait ainsi assurée.

Objectif no. 3

J'ai effectué une série d'expériences pour mieux comprendre la dimension temporelle de l'incorporation de H2A.Z dans la chromatine. J'ai construit une souche dont la transcription du gène *HTZI* est sous le contrôle d'un promoteur répressible. Je voulais ainsi bloquer la synthèse de H2A.Z jusqu'à la synchronisation des cellules, et lever la répression pour mesurer son insertion dans la chromatine à différents moments.

2. Résultats : localisation génomique des isoformes phosphorylées de l'ARN polymérase II

Afin de déterminer s'il existe des exceptions au modèle de phosphorylation du CTD de la sous-unité Rpb1 de l'ARN Pol II, j'ai déterminé la localisation, dans le génome entier de *S. cerevisiae*, de trois isoformes de la polymérase. Cette étude s'appuie en particulier sur la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), que je décrirai dans les prochaines lignes.

On capture les interactions entre une protéine d'intérêt et l'ADN *in vivo* grâce à un pontage par la formaldéhyde. L'ADN est fragmenté, puis la protéine et les séquences qu'elle lie sont co-enrichies lors d'une immunoprécipitation. Le pontage ADN-protéine est ensuite défait et les séquences d'ADN sont quantifiées par PCR ou par puce à ADN. Bref, la quantification des séquences d'ADN liées par la protéine permet une quantification de la présence de cette protéine aux régions interrogées. En ChIP-PCR, chaque séquence choisie est amplifiable par une paire d'amorces, et le nombre de régions d'ADN analysées dépend du nombre de PCR effectués. En ChIP-chip, on hybride les séquences d'ADN marquées sur une puce et on quantifie le signal de fluorescence généré. Le nombre de séquences analysées est défini par le nombre de sondes imprimées sur la puce à ADN.

Pour étudier la phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II sur les gènes, j'ai quantifié la localisation de ses isoformes phosphorylées, en utilisant un anticorps monoclonal pour chaque isoforme. Les anticorps les plus utilisés pour ce genre d'études sont H14, dirigé contre le CTD phosphorylé en sérine 5 (pSer-5) (Bregman et al., 1995), H5, qui reconnaît le CTD phosphorylé en sérine 2 (pSer-2) (Bregman et al., 1995), et 8WG16, dirigé contre les répétitions non phosphorylées du CTD (Non P) (Thompson et al., 1989). Généralement, on normalise ces données par rapport à la quantité de polymérase totale, en utilisant un anticorps dirigé contre la polymérase indépendamment de l'état de phosphorylation. Pour ce faire, il est fréquent de fusionner un épitope (ex : TAP, Myc, Flag, HA) à la polymérase et d'utiliser un anticorps contre cet épitope (Ahn et al., 2004; Cho et al., 2001; Komarnitsky et al., 2000; Morillon et al., 2003; Schroeder et al., 2000; Xiao et al., 2003). De plus, les anticorps N20 et C21, reconnaissant respectivement la partie N-terminale et C-terminale de

Pol II sont aussi utilisés (Cheng and Sharp, 2003; Morris et al., 2005). J'ai choisi d'utiliser les anticorps H14, H5 et 8WG16. Afin d'obtenir un contrôle indépendant de l'état de phosphorylation du CTD, j'ai inséré 9 copies de l'épitope Myc en C-terminal de la sous-unité Rpb1 et j'ai utilisé l'anticorps c-Myc. La création d'une nouvelle souche était nécessaire puisque la souche Rpb1-18myc qui était à ma disposition portait une mutation dans le gène *ASH1*, qui code pour un facteur de transcription. J'ai choisi de n'insérer que 9 copies de l'épitope myc pour éviter l'impact néfaste qu'aurait pu avoir une étiquette trop longue sur les interactions de Rpb1 avec d'autres protéines. La souche Rpb1-9myc a montré un phénotype de croissance normal et des expériences de PCR ont permis de vérifier que le nombre de copies de l'heptapeptide composant le CTD n'avait pas diminué (ce qui aurait pu être le cas suite à une recombinaison).

La souche Rpb1-9myc a été construite par recombinaison homologe d'un fragment contenant les 9 copies de l'épitope Myc et le gène *TRP1*, le tout bordé de courtes séquences (50 nt) identiques à la portion 3' de l'ORF et aux nucléotides suivant le codon de terminaison, ce qui a permis l'intégration au génome. La sélection des transformants a été faite sur gélose YNB -Trp, laquelle ne permet la croissance que des transformants ayant intégré le gène *TRP1*. Le criblage des intégrations correctes a été fait par PCR, à l'aide d'amorces ciblant le gène *RPB1* et le fragment intégré. Le résultat du criblage par PCR est montré dans la figure 3. Les transformants donnant le produit d'amplification attendu ont été analysés par *Western blot* pour vérifier la reconnaissance de l'étiquette 9myc par l'anticorps c-Myc (Fig. 4). Le transformant #3 a été choisi pour la suite des expériences et sera désigné « souche RPB1-9myc ».

Qu'il s'agisse du CHIP-PCR ou du CHIP-chip, on mesure non pas la quantité absolue de l'ADN immunoprécipité, mais l'enrichissement par rapport à de l'ADN contrôle. Celui-ci peut être l'ADN total ou le produit d'une immunoprécipitation contrôle. Dans le cas où la protéine d'intérêt est fusionnée à un épitope, le contrôle de type « immunoprécipitation » permet d'éliminer le bruit relié à l'anticorps. On procède à l'immunoprécipitation avec le même anticorps, mais sur un échantillon d'une souche où la protéine d'intérêt n'est pas étiquetée. J'ai utilisé le contrôle de type « immunoprécipitation » pour les échantillons étudiés avec l'anticorps c-Myc. Deux immunoprécipitations ont été faites : une dans la souche Rpb1-9myc et une dans la souche sauvage W303. Pour ce qui est des anticorps H14,

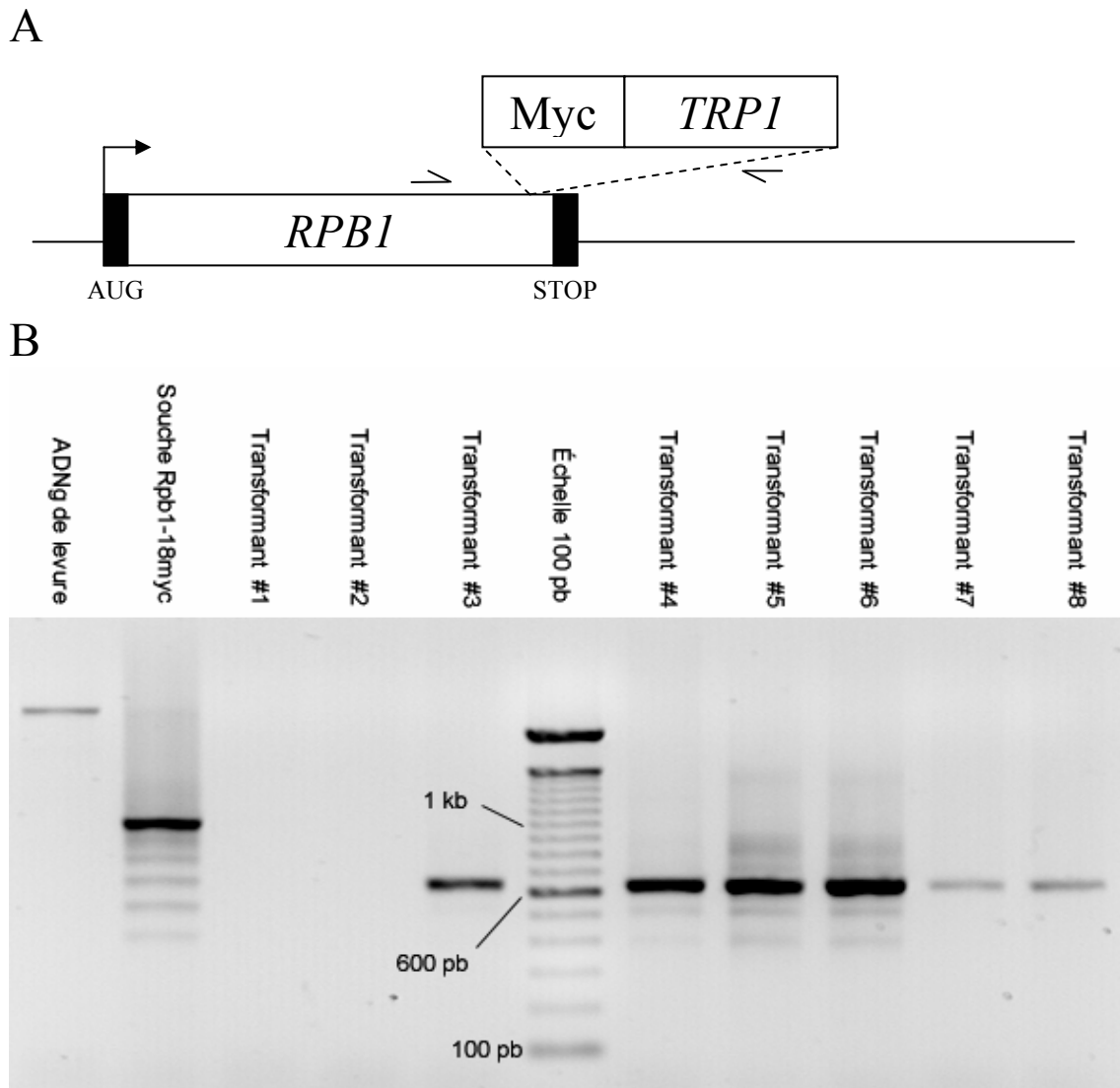


Figure 3. Criblage des intégrations correctes du fragment inséré en C-terminal du gène *RPBI*.

A) Schéma illustrant l'intégration du fragment contenant les séquences codant pour l'épitope Myc et le gène *TRP1* immédiatement avant le codon STOP du gène *RPBI*. Les demi-flèches indiquent la position des amorces ayant servi à cribler l'intégration.

B) Le PCR effectué avec des amorces ciblant *RPBI* et le fragment inséré donne une bande de 640 pb pour une intégration correcte. Un contrôle négatif d'ADN génomique de levure (sauvage) montre l'absence de produit de PCR (la bande visible est l'ADN génomique lui-même). Un contrôle positif *Rpb1-18myc* montre une bande à 1 kb, tel qu'attendu en raison de la taille plus grande du fragment intégré (18myc plutôt que 9myc). Les transformants #1 à #8 sont les colonies ayant été sélectionnées sur milieu YNB -Trp. Les transformants #3, 4, 5, 6, 7 et 8 montrent la bande attendue à 640 pb. Le transformant #3 a été retenu pour les expériences subséquentes.

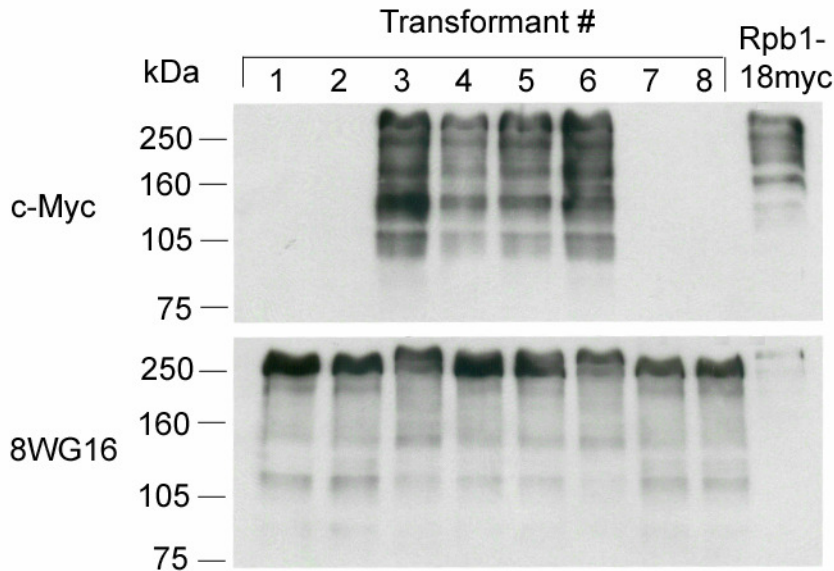


Figure 4. Vérification de la reconnaissance de la sous-unité Rpb1-9myc par l'anticorps c-Myc.

Les transformants #3, 4, 5 et 6 ainsi que le contrôle Rpb1-18myc montrent une série de bandes allant de plus de 250 kDa à environ 100 kDa. Les bandes situées sous la bande de taille maximale sont dues aux produits de dégradation de Rpb1. Une autre membrane a été hybridée avec l'anticorps 8WG16 pour contrôler la présence de Rpb1 dans tous les échantillons, qu'elle porte l'épitope myc ou non. La taille accrue de Rpb1 dans les échantillons #3, 4, 5 et 6 montre la présence de l'épitope 9myc, contribuant pour environ 15 kDa à la taille de la protéine fusionnée. Les produits de dégradation de Rpb1 y sont également visibles, tel qu'attendu.

H5 et 8WG16, le contrôle d'ADN total a été utilisé. Puisque ces anticorps reconnaissent un épitope naturel et non pas une étiquette portée par la protéine, le contrôle impliquant une immunoprécipitation dans une souche où la protéine d'intérêt ne porte pas d'étiquette était impossible à réaliser. En utilisant le contrôle d'ADN total, une plus grande quantité de bruit de fond relié aux anticorps a pu être introduite dans mes données, résultant en des enrichissements à des endroits du génome où il ne devrait pas y en avoir. Heureusement, lors de l'interprétation de enrichissements, j'ai eu à ma disposition quatre séries de données (une par anticorps utilisé), dont la comparaison entre elles m'a permis de m'assurer de la cohérence de mes résultats.

Les souches appropriées ont donc été cultivées et fixées par la formaldéhyde. L'ADN a été soniqué pour obtenir des fragments de 100 à 400 nt, ce qui permet d'obtenir une bonne résolution de localisation, tout en limitant la dénaturation ou la dégradation de l'ARN polymérase II. Pour chaque anticorps décrit plus haut, j'ai immunoprécipité la chromatine grâce à des billes magnétiques auxquelles étaient fixés les anticorps. Les interactions anticorps-protéine non spécifiques ont été éliminées par une série de lavages de stringence croissante. Le pontage moléculaire a été défait et l'ADN a été purifié. L'immunoprécipitation donne un rendement faible en ADN (quelques nanogrammes). Une étape d'amplification a donc été nécessaire avant la détection sur biopuces. La technique d'amplification utilisée, le LM-PCR (pour *Ligation-Mediated PCR*) nécessite la ligation d'adaptateurs unidirectionnels aux extrémités des fragments d'ADN. La sonication fragmente l'ADN de façon aléatoire et génère des extrémités non propices à cette ligation. Une étape de remplissage des extrémités par la T4 DNA polymérase a donc précédé la ligation franche des adaptateurs par la T4 DNA ligase. L'amplification par PCR a été faite en présence des 4 désoxyribonucléotides normaux (dATP, dTTP, dCTP et dGTP) et d'un nucléotide modifié, le 5-(3-aminoallyl)-dUTP. Celui-ci est un analogue du désoxyribo uridine triphosphate portant un groupement 3-aminoallyl en position 5 de son cycle uracile. L'incorporation de ce nucléotide modifié dans l'ADN amplifié et la réaction subséquente entre son groupement aminoallyl et le groupement ester NHS d'un fluorophore sont les étapes constituant le marquage indirect du matériel enrichi. Des fluorophores différents ont été utilisés pour le marquage de l'ADN enrichi et l'ADN contrôle. L'ADN enrichi a été marqué par le Cy5 et l'ADN contrôle par le Cy3, qui absorbent et fluorescent à des longueurs d'onde différentes (Mujumdar et al., 1993). Cela permet de déposer les deux

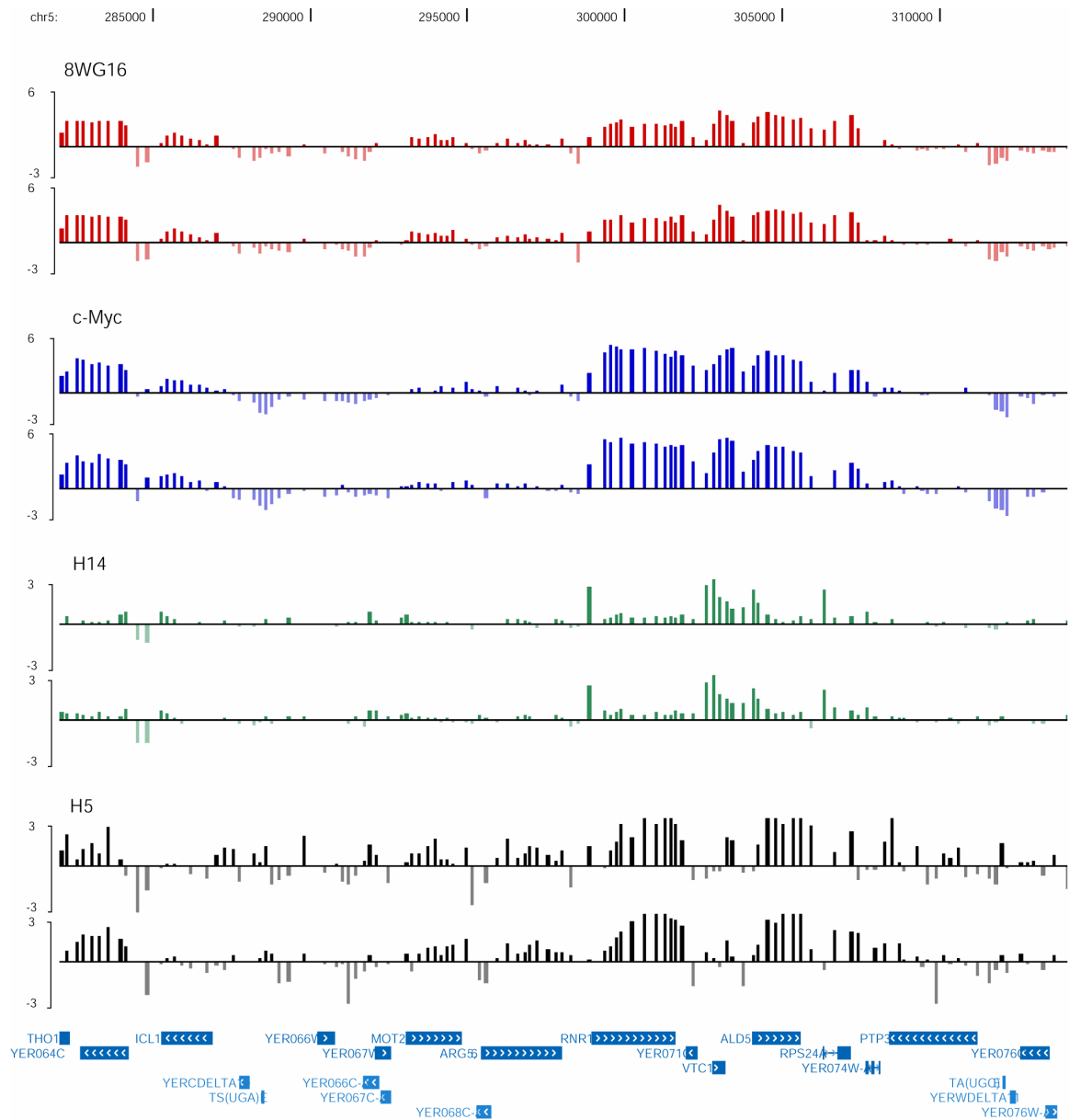


Figure 5. Concordance des valeurs d'enrichissement des réplicats biologiques.

L'enrichissement exprimé en logarithme (\log_2) est donné en ordonnée pour les deux réplicats de chaque anticorps : 8WG16, c-Myc, H14 et H5. La région située entre les nucléotides 282 000 et 314 000 du chromosome V est représentée. Les gènes contenus dans cette région sont montrés au bas de la figure.

ADN sur une même biopuce, pour qu'ils entrent en compétition pour la liaison des sondes qui y sont imprimées. Les puces utilisées contenaient 44 000 sondes d'en moyenne 50 nt couvrant le génome de *S. cerevisiae* en entier, à raison d'environ 4 sondes par kb d'ADN. Les signaux de fluorescence ont été analysés et une valeur d'enrichissement a été assignée pour chaque coordonnée chromosomique couverte par une sonde.

Les résultats obtenus par CHIP-chip sont généralement très reproductibles d'un échantillon à l'autre. C'est ce que nous observons dans la figure 5 : les niveaux d'enrichissement sont très semblables pour les deux répliquats d'un même anticorps. La concordance des répliquats est élevée pour les enrichissements d'environ 1 et plus, mais elle diminue dans les régions de faible enrichissement, qui ne correspondent pas à une véritable présence de la protéine, mais à un signal de « bruit de fond ». Celui-ci est dû entre autres à la reconnaissance non spécifique d'autres protéines par l'anticorps utilisé lors de l'immunoprécipitation et aux imperfections techniques liées à l'utilisation des biopuces. Malgré les régions où l'on observe une moins grande reproductibilité, les coefficients de corrélation de Pearson calculés pour l'ensemble des données demeurent élevés, à l'exception de l'enrichissement généré par l'anticorps H5. Les valeurs sont de 0.98, 0.93, 0.86 et 0.53 pour les anticorps 8WG16, c-Myc, H14 et H5, respectivement.

La normalisation des données brutes a été faite tel que décrit (Rufiange et al., 2007). Les répliquats ont été combinés par un algorithme de moyenne pondérée. Cette pondération est basée sur une *p-value* dont la valeur est influencée par l'intensité de fluorescence des molécules d'ADN hybridées sur la biopuce et l'intensité du bruit de fond de fluorescence. L'ampleur du bruit de fond est déterminée en faisant la déviation standard de l'intensité de fluorescence mesurée autour de chaque cercle où sont imprimées les sondes, ce qui correspond à mesurer la fluorescence aux endroits où aucune sonde n'est imprimée. Cette méthode permet de s'assurer que les valeurs associées à un ratio « signal sur bruit » faible auront peu de poids (peu d'importance) lors de la combinaison des répliquats. Il en résulte donc un ensemble de données combinées plus susceptibles de représenter la réalité. Une représentation des résultats combinés sur le chromosome III est montrée à la figure 6. On peut observer que l'enrichissement n'est pas distribué uniformément, mais concentré dans des régions discrètes, correspondant aux gènes transcrits dans les conditions de culture utilisées. La figure 7 offre une vue détaillée du gène *PGK1* situé sur le chromosome III,

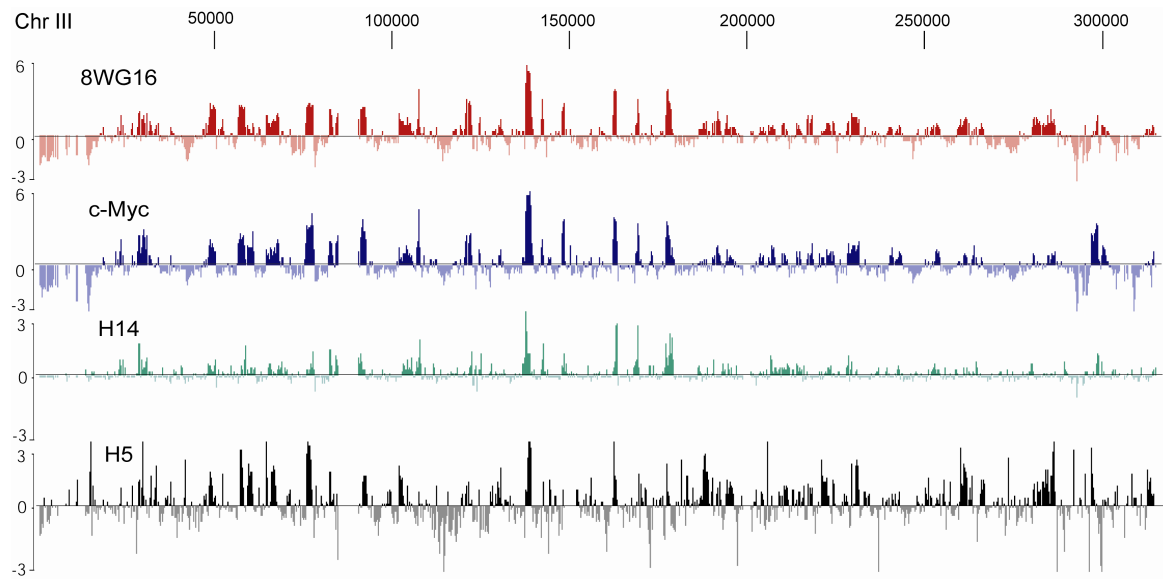


Figure 6. Enrichissement combiné à partir de deux réplicats de chaque anticorps.

Résultats montrés pour le chromosome III entier. L'enrichissement est calculé comme dans la figure 5.

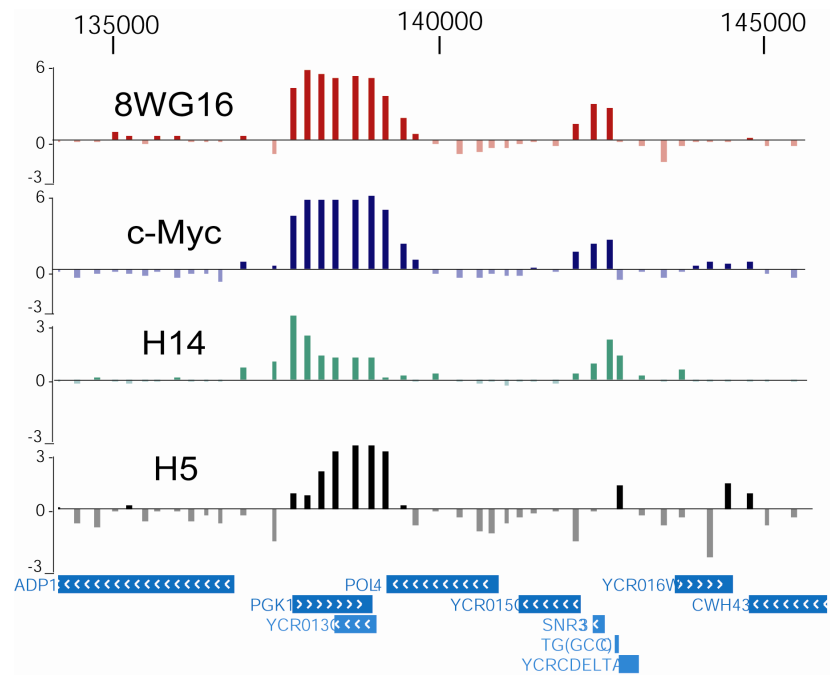


Figure 7. Le gène *PGK1* est représentatif de la majorité des gènes du génome de *S. cerevisiae*.

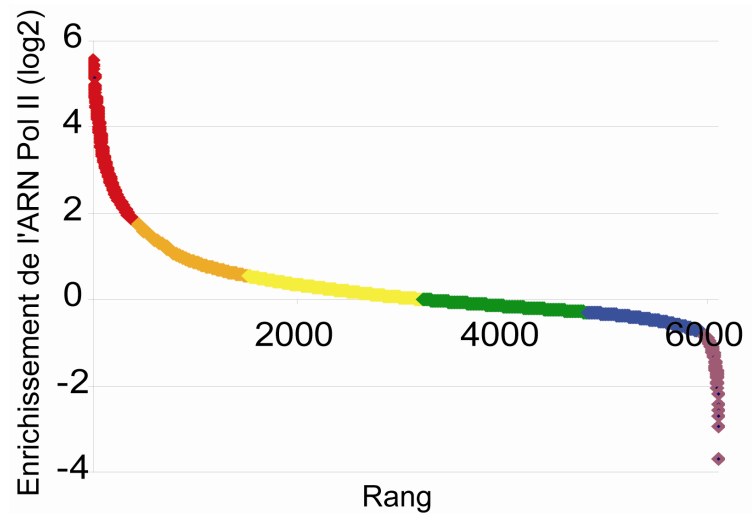
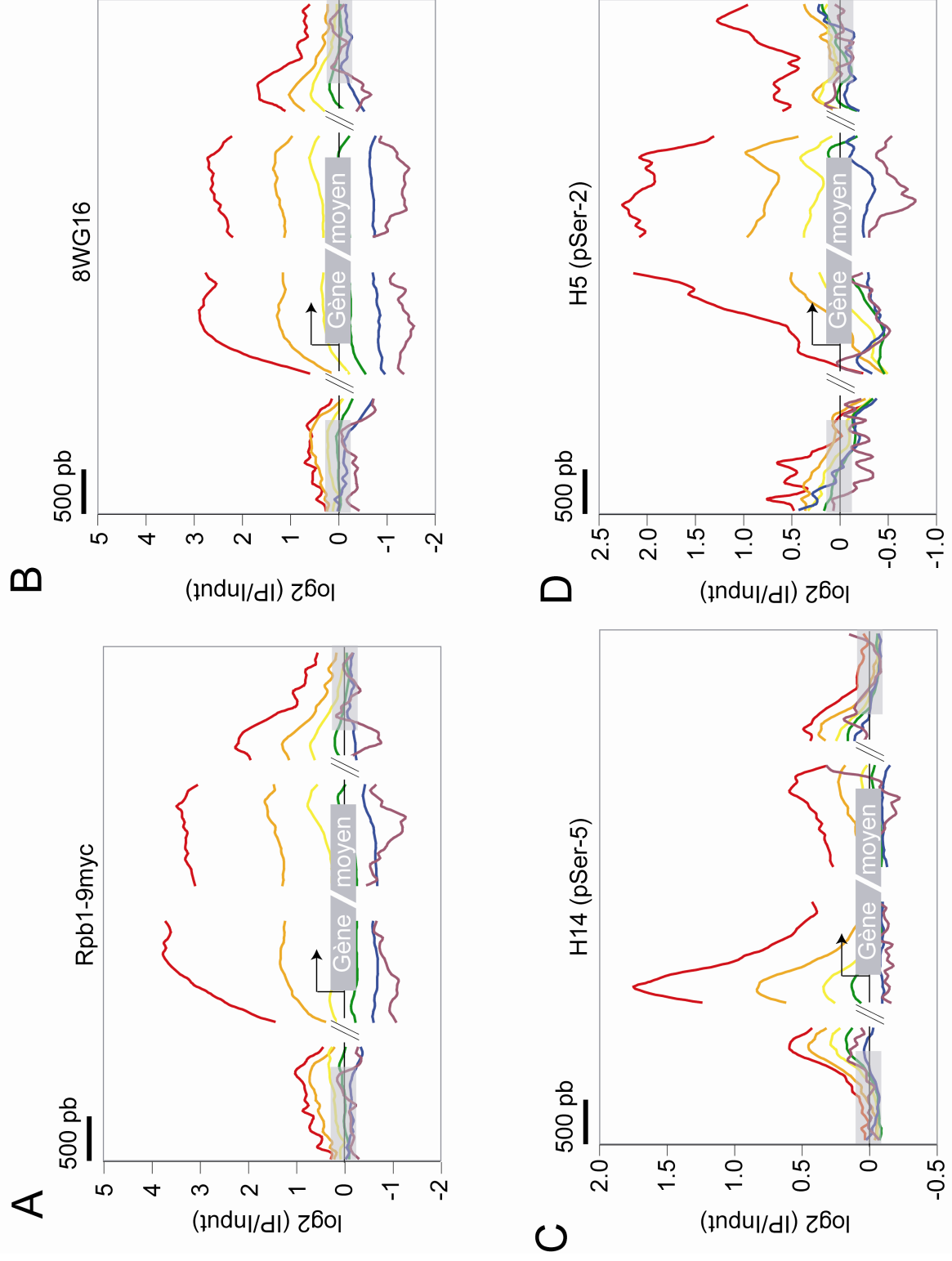


Figure 8. Séparation des gènes de *S. cerevisiae* en 6 classes, en fonction de leur niveau de transcription.

Le niveau de transcription a été déduit de l'enrichissement de l'ARN Pol II déterminé par nos expériences de ChIP-chip avec l'anticorps c-Myc. La classe des gènes les plus transcrits et celle des moins transcrits a été délimitée par le point d'inflexion de la courbe. Le reste des gènes a ensuite été distribué également en 4 classes.



dont le profil d'enrichissement est représentatif de la majorité des gènes. L'ARN Pol II est présente de façon presque constante sur tout le gène (8WG16 et c-Myc), la forme pSer-5 est située dans la partie 5' alors que la forme pSer-2 se situe en 3'.

Afin d'obtenir le profil d'enrichissement moyen pour des classes de gènes semblables, j'ai séparé les gènes de *S. cerevisiae* en 6 sous-ensembles, selon leur niveau de transcription (Fig. 8). Les gènes d'une même classe ont été alignés sur leur codon d'initiation et leur codon de terminaison, et la moyenne d'enrichissement autour du codon d'initiation et du codon de terminaison a été calculée (Fig. 9). En considérant les gènes possédant les plus hauts niveaux de transcription (courbe rouge), nous voyons que le profil global de la présence de la polymérase et de ses formes phosphorylées en sérine 2 et 5 correspond bien à celui décrit précédemment pour le gène *PGK1*. Les enrichissements de 8WG16 et c-Myc sont constants sur tout le gène. La phosphorylation en sérine 5 du CTD atteint un maximum dans la région 5' et décroît dans l'ORF. À l'inverse, le niveau de pSer-2 est faible en 5' du gène et augmente rapidement dans l'ORF. En inspectant plus précisément le panneau C de la figure 9, on observe une légère augmentation du niveau de pSer-5 vers la fin des gènes les plus transcrits. Cela pourrait être dû à un phénomène de *looping*, c'est-à-dire la formation d'une boucle entre les régions promotrices et terminatrices d'un même gène (Singh and Hampsey, 2007). La polymérase phosphorylée en Ser-5 serait présente à proximité de la portion 3' des gènes en question. L'immunoprécipitation causerait un enrichissement de ces séquences en 3' et l'apparition du signal observé dans la figure 9 C. Cependant, il est difficile d'expliquer l'absence apparente du phénomène inverse, c'est-à-dire la présence d'un signal de pSer-2 en 5' des gènes (Fig. 9 D).

Même si les gènes, pris dans leur ensemble, m'ont semblé être transcrits selon le modèle de phosphorylation classique, j'ai trouvé des exceptions lors de mes inspections manuelles des données dans le fureteur de UCSC (Mangan et al., 2008). Le gène *GITI*, situé sur le chromosome III, en est un exemple (Fig. 10). L'enrichissement généré par 8WG16 y est anormalement faible et suit une tendance semblable à celle de pSer-5. En comparaison, l'enrichissement par c-Myc est tel qu'attendu.

L'observation de ce type d'exceptions m'a amené à analyser systématiquement tous les gènes afin de déceler différents types d'exceptions. Je me suis intéressé principalement aux

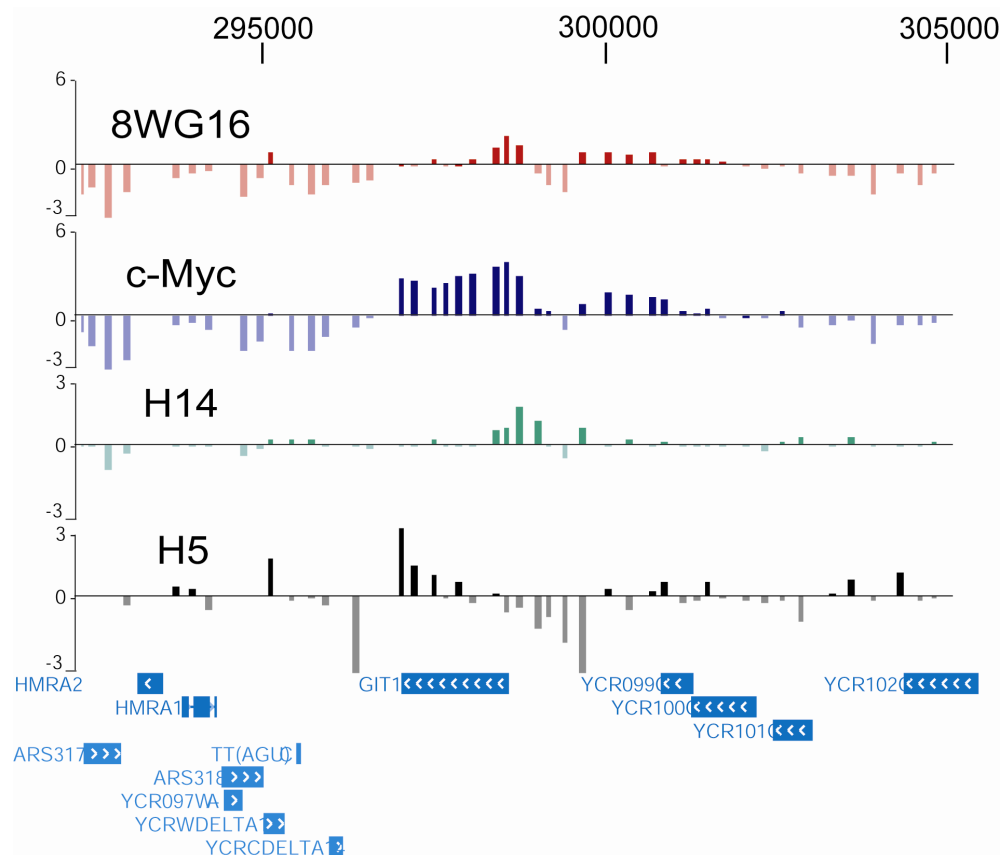


Figure 10. Exemple de gène possédant un enrichissement exceptionnellement faible de l'anticorps 8WG16.

Lors de notre inspection manuelle des données, nous avons considéré le gène *GIT1* comme exceptionnel puisque son enrichissement de 8WG16 est nettement inférieur à celui de c-Myc.

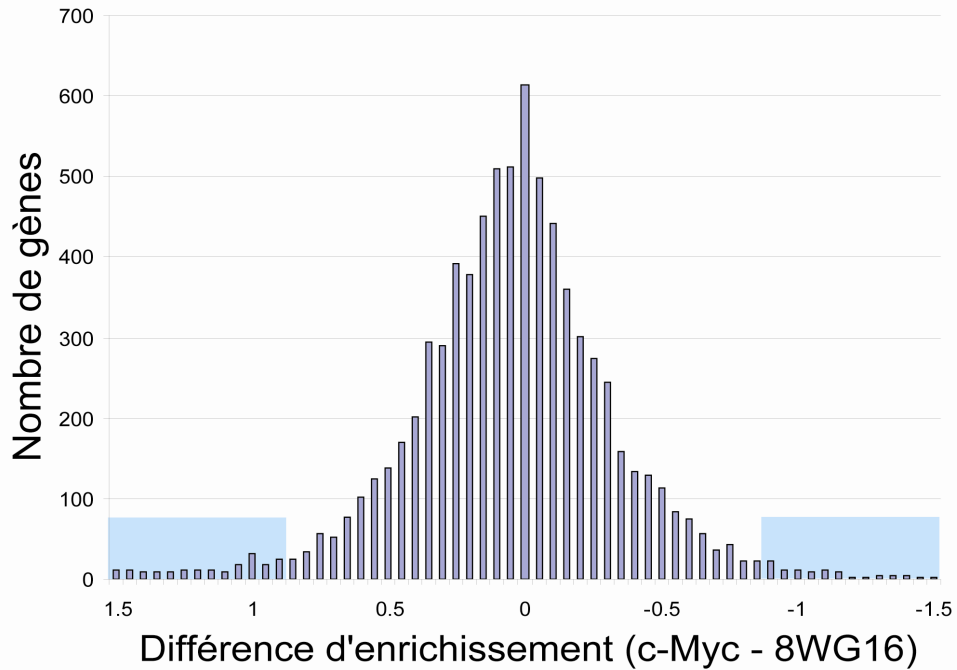


Figure 11. Distribution des gènes en fonction de leur différence d'enrichissement entre c-Myc et 8WG16.

Des blocs de différences ont été créés et le nombre de gènes appartenant à chaque bloc a été calculé. Les gènes possédant une différence significative sont situés à l'intérieur des panneaux en bleu pâle de chaque côté de la distribution.

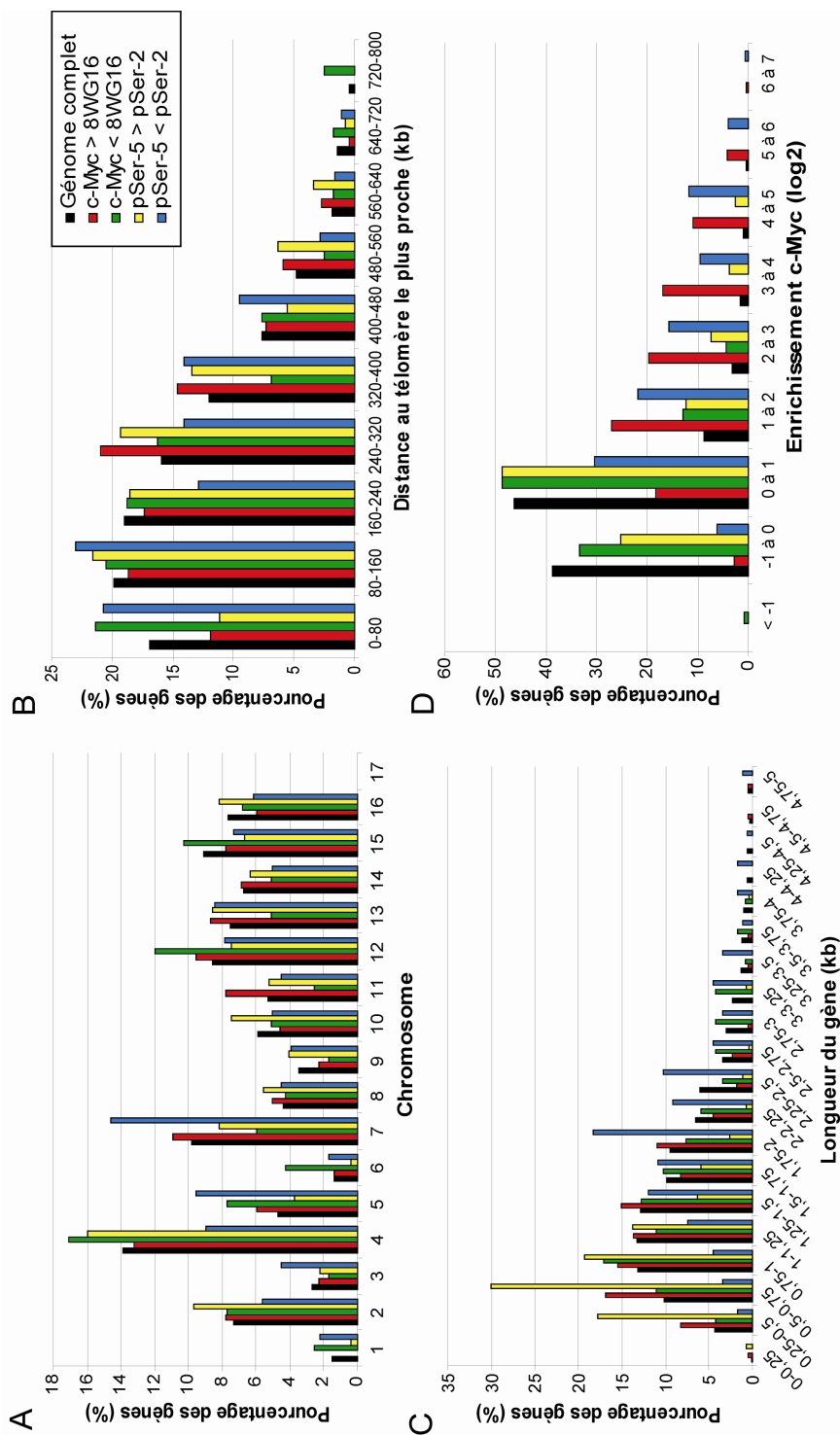


Figure 12. Détermination des caractéristiques communes aux gènes possédant un même type d'exception.

A) Distribution chromosomique, B) Distance au télomère le plus proche, C) Longueur du gène, D) Niveau de transcription donné par l'enrichissement de l'anticorps c-Myc. Le pourcentage des gènes d'une catégorie (couleur) appartenant à une variable (valeurs en abscisse) est indiqué. Le génome complet (noir) représente les distributions normales pour l'ensemble des gènes. Les quatre catégories d'exceptions { c-Myc > 8WG16 (rouge), c-Myc < 8WG16 (vert), pSer-5 > pSer-2 (jaune) et pSer-5 < pSer-2 (bleu) } sont définies par la valeur du ratio d'un anticorps par rapport à l'autre uniquement. Par exemple, pSer-5 > pSer-2 (jaune) peut dénoter un fort enrichissement de pSer-5 ou un faible enrichissement de pSer-2.

débalancements significatifs entre les anticorps 8WG16 et c-Myc, aux niveaux anormalement faibles ou élevés de pSer-5 et/ou pSer-2, à la présence plus ou moins élevée de la polymérase sur une portion du gène, à la persistance de pSer-5 sur l'ORF ainsi qu'à l'apparition prématurée de pSer-2 en 5' du gène.

Lors de mon analyse, j'ai d'abord « lissé » les données afin d'obtenir des valeurs entre les sondes, tel que décrit précédemment (Guillemette et al., 2005). J'ai calculé l'enrichissement moyen sur chacun des gènes, pour les quatre anticorps. Pour chaque gène, j'ai ensuite comparé les anticorps entre eux, en effectuant des différences de moyennes. Rappelons que les enrichissements sont exprimés en logarithmes, et qu'une différence de logarithmes correspond à une division de nombres normaux (donc un ratio). J'ai ensuite trié les gènes en fonction de l'ampleur de la différence sélectionnée. J'ai ainsi généré des courbes de distributions. La distribution des gènes en fonction de leur différence d'enrichissement entre c-Myc et 8WG16 est donnée en exemple (Fig. 11). Tel qu'attendu, la majorité des gènes se comportent de façon semblable. Par ailleurs, plusieurs gènes ont une différence élevée ou faible par rapport à la normale. À l'aide des graphiques de distribution, j'ai choisi les seuils (seuils de différences à atteindre pour que ces différences soient considérées comme significatives) en fonction des points d'inflexion des courbes, et j'ai généré des listes de gènes correspondant à ces critères.

J'ai d'abord tenté de trouver des caractéristiques communes à ces gènes exceptionnels. Je les ai distribués en fonction du chromosome sur lequel ils sont situés, leur distance par rapport au télomère le plus proche, leur longueur et leur niveau de transcription (Fig. 12). Je n'ai pas trouvé de particularité concernant la distribution chromosomique et la distance au télomère parmi les classes d'exceptions. L'analyse de la longueur des gènes, quant à elle, a révélé que les gènes ayant un ratio pSer-5 / pSer-2 élevé sont plus courts que la normale, et que les gènes ayant un ratio pSer-5 / pSer-2 faible sont plus longs que la normale. Cela est explicable par le fait que la polymérase qui transcrit les gènes courts ne semble pas avoir le temps d'accumuler la phosphorylation en sérine 2, à moins que celle-ci ne survienne que dans un espace limité et qu'elle ne soit pas détectable avec la résolution de la technique utilisée. Par ailleurs, les gènes longs peuvent accumuler des niveaux plus élevés de pSer-2, simplement parce que cette phosphorylation apparaît après quelques centaines de nucléotides et qu'elle demeure relativement constante jusqu'à la fin de la transcription. Ces

Tableau I. Processus et composantes communs aux gènes composant les groupes d'exceptions.

Les listes de gènes exceptionnels ont été soumises à l'outil bioinformatique GO Term Finder et les résultats possédant une valeur p inférieure à 10^{-4} ont été retenus.

Catégorie d'exception	Nombre de gènes possédant l'exception		Nombre d'exceptions possédant ce processus / composante	% d'exceptions possédant ce processus / composante	% du génome possédant ce processus / composante	valeur p
c-Myc > 8WG16	135	Processus				
		-	-	-	-	-
		Composante				
		Paroi cellulaire de type « fungi »	18	13.3	1.3	3.58E-12
		Structure encapsulante externe	18	13.3	1.4	2.42E-11
		Paroi cellulaire	18	13.3	1.4	2.42E-11
		Nucléosome	8	5.9	0.2	1.71E-10
		Nucléosome nucléaire	8	5.9	0.2	1.71E-10
		Membrane cytoplasmique	19	14.1	3.7	3.82E-05
		Chromatine	9	6.7	0.8	9.44E-05
		c-Myc < 8WG16	18	Processus		
Repliement des protéines	5			27.8	1.1	9.64E-05
Composante						
-	-			-	-	-
pSer-5 > pSer-2	45	Processus				
		-	-	-	-	-
		Composante				
		Nucléosome	6	13.3	0.2	1.20E-09
		Nucléosome nucléaire	6	13.3	0.2	1.20E-09
		Chromatine	7	15.6	0.8	3.44E-06
Chromatine nucléaire	6	13.3	0.6	2.06E-05		

Tableau I (suite).

Catégorie d'exception	Nombre de gènes possédant l'exception		Nombre d'exceptions possédant ce processus / composante	% d'exceptions possédant ce processus / composante	% du génome possédant ce processus / composante	valeur p	
pSer-5 < pSer-2	65	Processus					
		Glycolyse	7	10.8	0.2	7.50E-09	
		Métabolisme des acides carboxyliques	18	27.7	4.4	3.26E-08	
		Métabolisme des acides organiques	18	27.7	4.4	3.26E-08	
		Métabolisme des alcools	13	20	2.2	1.65E-07	
		Métabolisme du pyruvate	7	10.8	0.3	2.95E-07	
		Catabolisme du glucose	7	10.8	0.4	4.01E-07	
		Métabolisme des acides monocarboxyliques	11	16.9	1.6	1.12E-06	
		Catabolisme des hexoses	7	10.8	0.4	1.55E-06	
		Biosynthèse des alcools	7	10.8	0.5	4.74E-06	
		Catabolisme des monosaccharides	7	10.8	0.5	4.74E-06	
		Processus biosynthétique	30	46.2	16.9	6.25E-06	
		Catabolisme des alcools	7	10.8	0.5	8.56E-06	
		Métabolisme du glucose	7	10.8	0.6	2.05E-05	
		Métabolisme des hexoses	8	12.3	1	3.44E-05	
		Métabolisme des monosaccharides	8	12.3	1.1	7.30E-05	
		Composante					
Paroi cellulaire de type « fungi »	8	12.3	1.3	8.09E-05			

Tableau II. Gènes exceptionnels (liste filtrée par inspection systématique).

Gène	Alias	Exception	Remarque
<i>YDL037C</i>	<i>BSC1</i>	Absence d'enrichissement de 8WG16	
<i>YCR098C</i>	<i>GIT1</i>	Absence d'enrichissement de 8WG16 sur l'ORF	
<i>YJR103W</i>	<i>URA8</i>	Pause au promoteur	
<i>YML028W</i>	<i>TSA1</i>	Faible phosphorylation des Ser-2	
<i>YDR399W</i>	<i>HPT1</i>	Faible phosphorylation des Ser-2	
<i>YGL030W</i>	<i>RPL30</i>	Faible phosphorylation des Ser-2	Contient un intron
<i>YOR293W</i>	<i>RPS10A</i>	Faible phosphorylation des Ser-2	Contient un intron
<i>YFL034C-A</i>	<i>RPL22B</i>	Faible phosphorylation des Ser-2	Contient un intron
<i>YDL125C</i>	<i>HNT1</i>	Faible phosphorylation des Ser-2	Contient un intron
<i>YPL081W</i>	<i>RPS9A</i>	Apparition tardive de pSer-2	Contient un intron
<i>YNL301C</i>	<i>RPL18B</i>	Apparition tardive de pSer-2	Contient un intron
<i>YDR064W</i>	<i>RPS13</i>	Apparition tardive de pSer-2	Contient un intron
<i>YER091C</i>	<i>MET6</i>	Faible phosphorylation des Ser-5 qui persiste sur l'ORF	
<i>YGR175C</i>	<i>ERG1</i>	Quasi-absence de pSer-5	
<i>YGR279C</i>	<i>SCW4</i>	Quasi-absence de pSer-5	
<i>YIL169C</i>	-	Absence de phosphorylation des Ser-5	
<i>YOL155C</i>	-	Absence de phosphorylation des Ser-5	

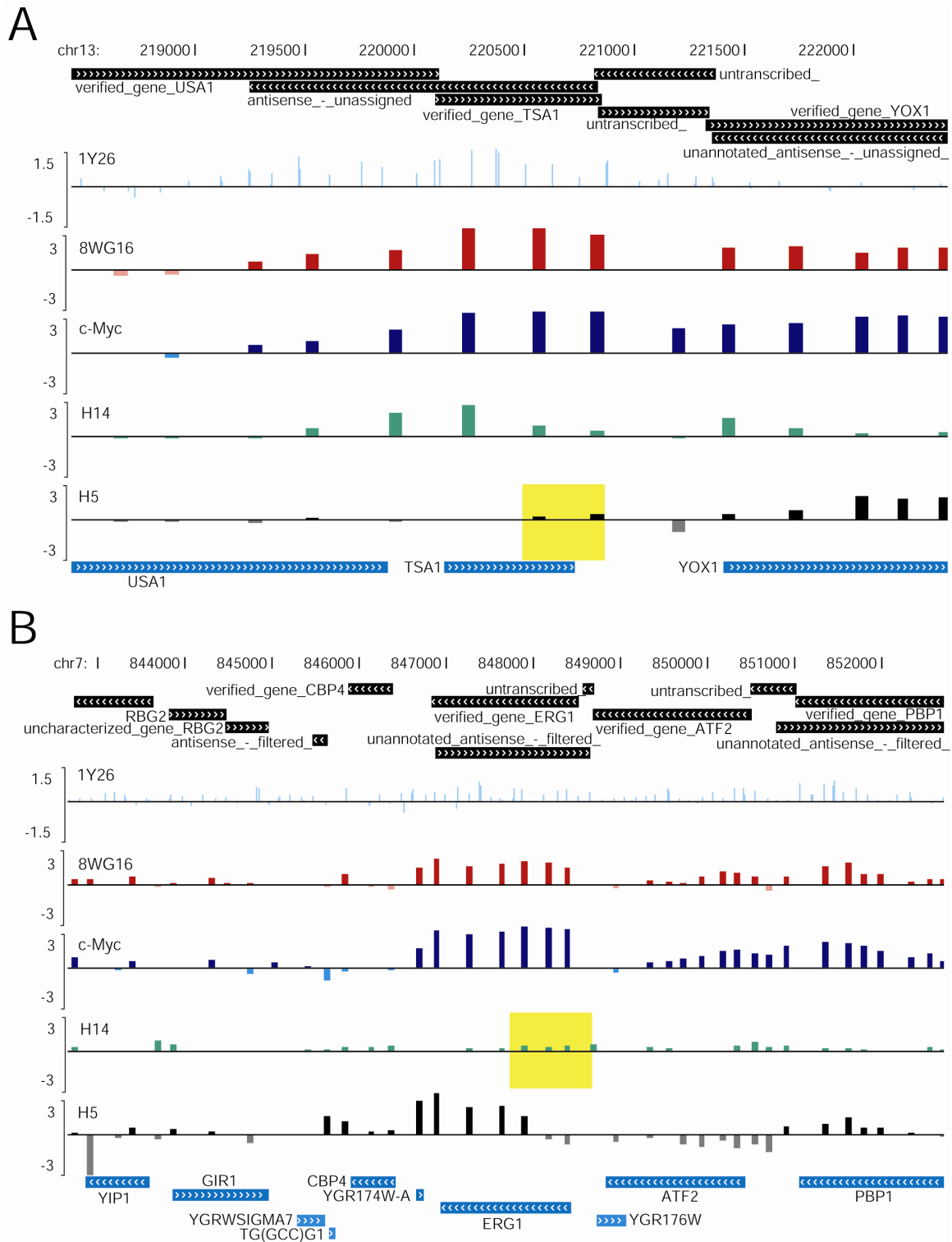


Figure 13. Exemples représentatifs des exceptions d'enrichissement retenues après inspection visuelle.

1Y26 : immunoprécipitation de la sous-unité Rpb3 de l'ARN Pol II par l'anticorps 1Y26 (Steinmetz et al., 2006). Les transcrits d'ARN connus (en noir) sont montrés sous les coordonnées chromosomiques (David et al., 2006) et les gènes connus (en bleu) sont montrés au bas de chaque panneau. Les exceptions sont indiquées par une boîte jaune.

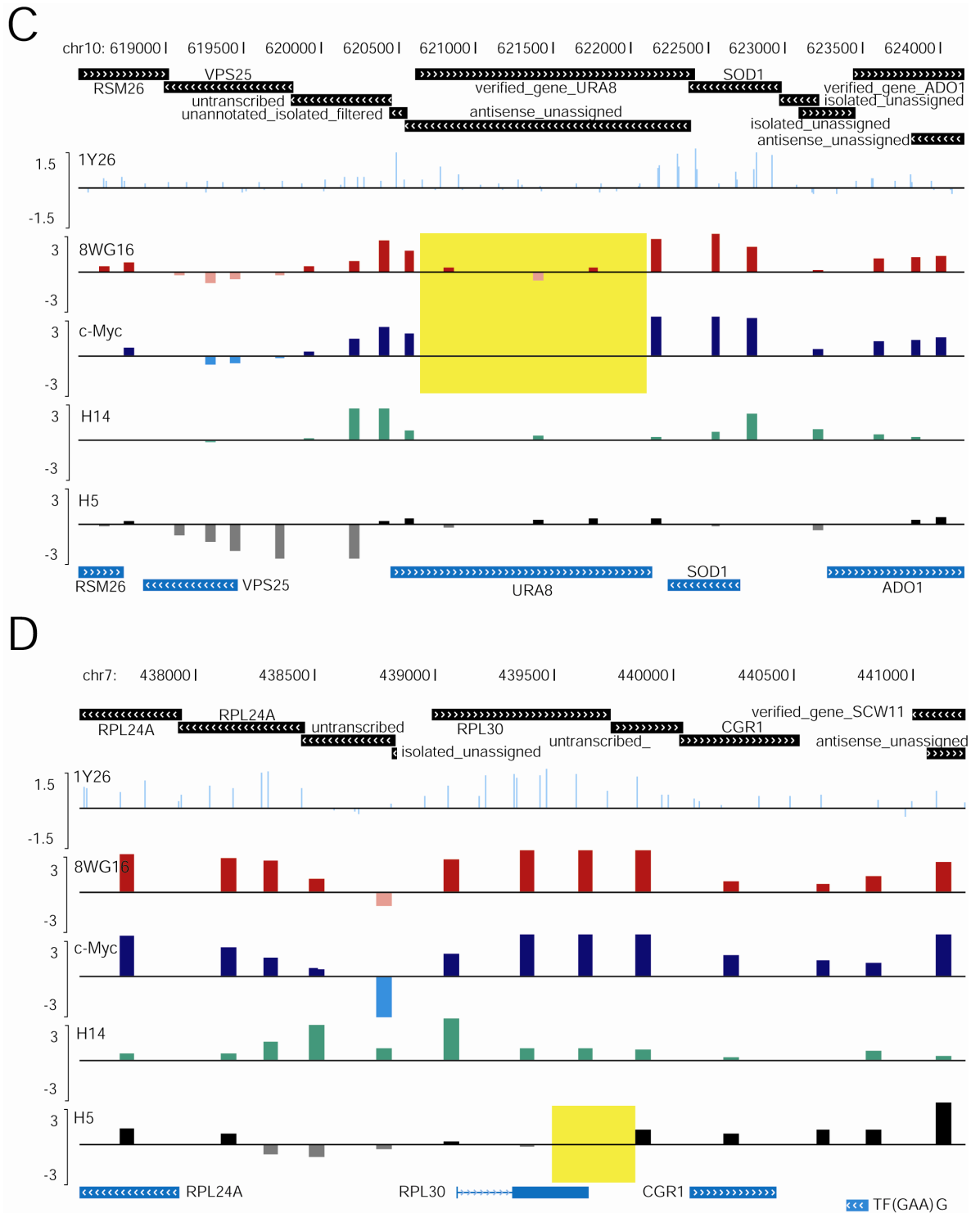


Figure 13 (suite).

A) Faible enrichissement de pSer-2 (H5) en 3' du gène *TSAI*. B) Faible enrichissement de pSer-5 (H14) en 5' gène *ERGI*. C) Absence de polymérase (8WG16 et c-Myc) sur la majorité de l'ORF de *URA8*. D) Faible enrichissement de pSer-2 (H5) en 3' du gène *RPL30*.

situations, maintes fois observées en parcourant le génome à l'aide du fureteur UCSC, ne m'ont pas semblé anormales. Par ailleurs, la distribution des gènes exceptionnels en fonction de leur enrichissement de c-Myc m'a permis d'éliminer l'hypothèse que les exceptions sont retrouvées plus fréquemment chez les gènes faiblement ou fortement transcrits, puisque cette distribution ressemble à celle de l'ensemble des gènes (Fig. 12D).

Afin de trouver une composante ou un processus biologique commun aux gènes exceptionnels, j'ai utilisé l'outil GO Term Finder de la banque de données SGD (Hong et al., 2008). De façon intéressante, quelques composantes et processus biologiques sont partagés par une fraction significative des gènes analysés. J'ai listé les résultats les plus significatifs dans le tableau I. Une partie des gènes possédant un ratio c-Myc / 8WG16 élevé semblent coder pour des composantes de la paroi cellulaire ou de la chromatine. Des composantes de la chromatine semblent aussi être codées par des gènes ayant un ratio pSer-5 / pSer-2 élevé, alors que des composantes de la paroi cellulaire sont aussi codées par des gènes ayant un ratio pSer-5 / pSer-2 faible. De nombreux gènes ayant un ratio pSer-5 / pSer-2 faible sont impliqués dans le métabolisme. Bien qu'il soit intéressant de constater que certains types d'exceptions d'enrichissements sont associés à des fonctions et/ou des composantes biologiques, celles-ci demeurent générales et ne permettent pas d'expliquer les exceptions observées.

J'ai alors choisi d'étudier les gènes exceptionnels individuellement, à l'aide de méthodes expérimentales adaptées à chaque situation. Cette approche a d'abord nécessité la sélection des meilleurs candidats par inspection visuelle. J'ai ainsi éliminé les gènes dont les valeurs extrêmes de ratios d'enrichissement sont explicables par l'environnement. Cela inclut la présence d'un gène transcrit à proximité, la faible longueur du gène ou la transcription d'un ARN antisens. La liste des transcrits connus (David et al., 2006), tel que montré à la figure 13, a été particulièrement utile lors de cette sélection. La liste des gènes retenus est présentée dans le tableau II. Quatre gènes faisant partie de cette liste sont montrés à la figure 13. Ils représentent les quatre types d'exceptions les plus intéressants d'un point de vue biologique. Le gène *TSAI* (Fig. 13A) possède un faible enrichissement des pSer-2 (H5) à son extrémité 3', alors que les niveaux de polymérase totale (8WG16 et c-Myc) et de pSer-5 (H14) sont normaux. À l'inverse, le gène *ERGI* (Fig. 13B) montre un niveau faible de pSer-5, alors que les autres enrichissements semblent normaux. De façon intéressante, le

gène *URA8* (Fig. 13C) semble constituer un exemple de pause de la polymérase au promoteur, puisque des niveaux élevés d'enrichissement par les anticorps 8WG16 et c-Myc sont détectés au promoteur et dans la partie 5' du gène uniquement. Enfin, le gène *RPL30* (Fig. 13D) partage le même type d'exception que le gène *TSA1* (Fig. 13A), soit un niveau faible de pSer-2. Je le considère toutefois dans une classe à part, car j'ai observé 7 exemples de niveaux faibles de pSer-2 chez des gènes possédant un intron.

La détection des séquences d'ADN par biopuce est basée sur leur hybridation à des sondes fixées sur une lame de verre. Il arrive parfois qu'à cause de défauts dans le matériel, l'hybridation s'effectue mal sur certaines sondes, ce qui peut entraîner le rejet de certaines données. Dans un tel cas, les coordonnées chromosomiques touchées auront une valeur nulle. Certaines exceptions répertoriées, comme l'absence d'enrichissement d'un anticorps à un endroit précis d'un gène, pourraient être expliquées de cette façon. J'ai donc voulu vérifier les enrichissements sans l'utilisation des puces à ADN, soit par ChIP-qPCR. L'immunoprécipitation de la chromatine a été effectuée pour les anticorps c-Myc, H14 et H5 dans les mêmes conditions utilisées précédemment. L'enrichissement a ensuite été mesuré à quelques endroits sur les gènes par PCR quantitatif en temps réel (qPCR). Les valeurs ont été exprimées en logarithme (\log_2) pour être comparées à celles obtenues par ChIP-chip. Au moment d'écrire ce mémoire, les exceptions de deux gènes ont été confirmées (Fig. 14). Le ChIP-chip m'a permis d'identifier *TSA1* et *HPT1* comme des gènes ne possédant pas d'accumulation de pSer-2 dans leur portion 3' terminale. Le ChIP-qPCR a confirmé ce résultat. Les valeurs illustrées à la figure 14 semblent constantes mais élevées sur toute la longueur des gènes *TSA1* et *HPT1*. Ces valeurs d'environ 1 sont cependant inférieures à celle de 4,5 mesurée par ChIP-qPCR pour un enrichissement normal de H5 sur le gène *MET6* (non montré). Cela implique que *TSA1* et *HPT1* ont effectivement une absence d'enrichissement de pSer-2 dans leur portion 3'. Notons que des contraintes de temps m'ont forcé à n'étudier que les gènes *TSA1* et *HPT1* par qPCR, mais que la confirmation de tous les cas d'exceptions devrait être effectuée avant de procéder à d'autres expériences dans le but de comprendre la raison d'être de ces exceptions.

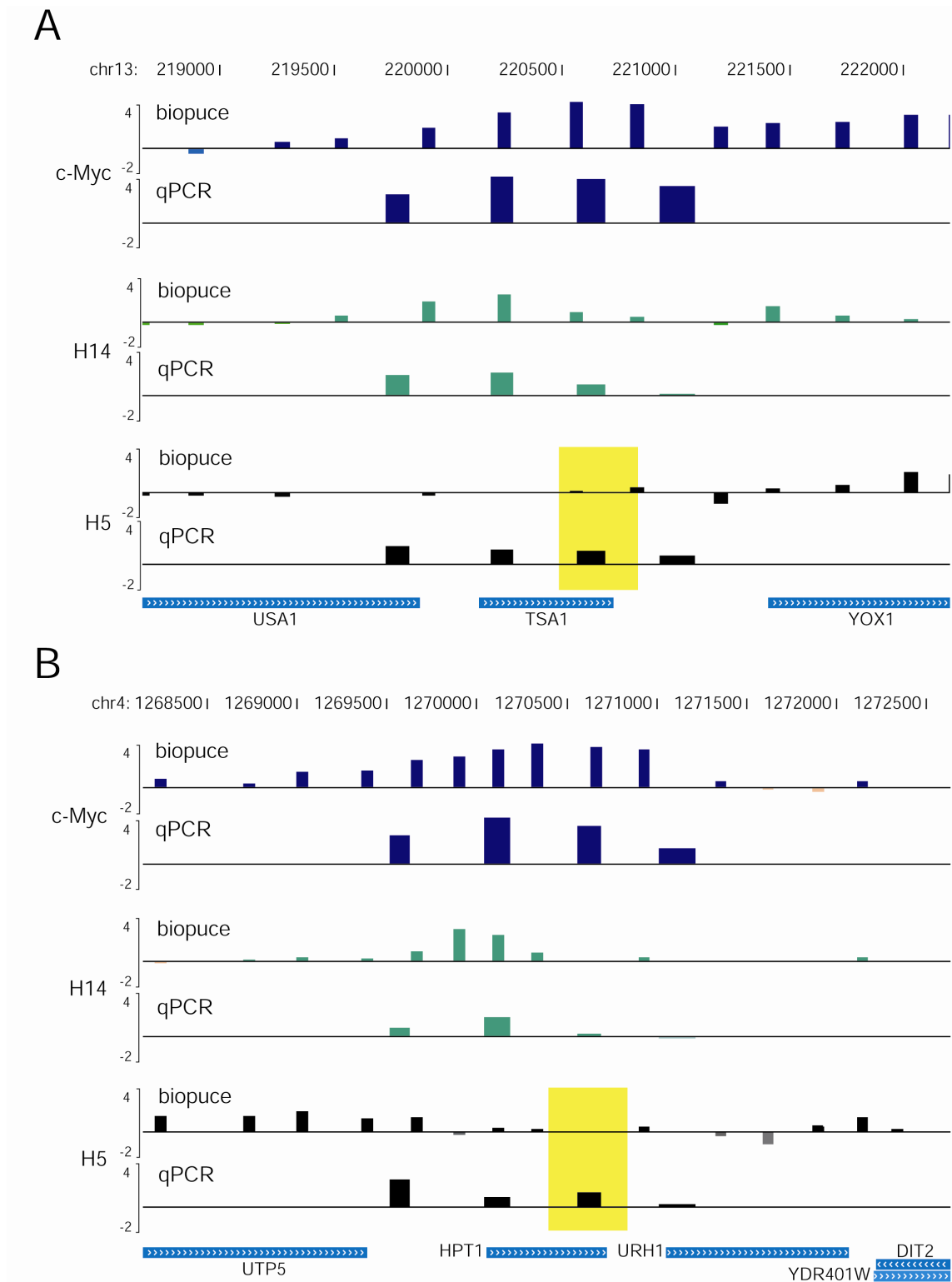


Figure 14. Vérification des enrichissements de deux gènes exceptionnels par ChIP-qPCR.

Les enrichissements déterminés précédemment par ChIP-chip sont comparés à ceux obtenus par ChIP-qPCR. Les valeurs sont exprimées en logarithme (\log_2). La technique de ChIP-qPCR a permis de confirmer la faible présence de pSer-2 (H5) en 3' des gènes *TSA1* (A) et *HPT1* (B).

3. Résultats : implication de H2A.Z dans le positionnement des nucléosomes

Afin de mieux comprendre le ou les mécanismes par lesquels H2A.Z module la transcription, j'ai étudié l'implication de cette histone dans le positionnement des nucléosomes. Plus précisément, j'ai localisé les nucléosomes dans une souche sauvage (W303) et une souche dont le gène de H2A.Z a été délété (*htz1Δ*) afin de vérifier si la délétion de H2A.Z entraîne des pertes ou des déplacements de nucléosomes, ou influence leur mobilité.

La méthode que j'ai utilisée pour localiser les nucléosomes est basée sur la digestion de la chromatine par une DNase appelée "nucléase micrococcalle" (acronyme anglais : MNase). Cette enzyme dégrade l'ADN qui n'est pas enroulé autour des octamères d'histones. Ainsi, l'ADN nucléosomal est protégé contre la digestion par la MNase. La purification et la détection à grande échelle des séquences d'ADN situées dans les nucléosomes permet d'établir un profil global de la position des nucléosomes dans le génome. La détection des séquences nucléosomales a été réalisée à l'aide de biopuces semblables à celles utilisées pour la localisation de l'ARN Pol II (chapitre 2). La technique porte alors le nom de "MNase-chip".

Comme dans le cas de l'immunoprécipitation de la chromatine, le MNase-chip permet de déterminer l'enrichissement de séquences d'ADN par rapport à un contrôle. En théorie, ce contrôle devrait être constitué de séquences d'ADN représentant tout le génome et dont les tailles sont semblables à celle de l'ADN mononucléosomal. Afin de produire le contrôle le moins biaisé possible, j'ai digéré par la MNase de l'ADN génomique purifié pour générer un ensemble de fragments de tailles situées en majorité de 100 à 600 pb. La digestion de l'ADN contrôle par la même enzyme qui a généré l'ADN mononucléosomal a l'avantage d'éliminer le biais provenant de la digestion préférentielle de certaines séquences par la MNase, s'il y a lieu.

L'ADN mononucléosomal et l'ADN contrôle ont d'abord nécessité l'isolation des noyaux de levures. Dans le cas de l'ADN mononucléosomal (Fig. 15B), le lysat nucléaire a été

digéré avec 150 U de MNase. L'ADN mononucléosomal a ensuite été séparé des fragments de tailles inférieures à 100 pb par purification sur colonne, puis il a été séparé de l'ADN digéré de façon incomplète par purification sur gel. Pour ce qui est de l'ADN génomique, l'ARN contaminant a été éliminé par un traitement à la RNase A (Fig. 15A). L'ADN a ensuite été digéré par la MNase pour générer l'ADN contrôle. Un exemple de digestion est montré à la figure 15C (temps de digestion idéal : 22 minutes). Mentionnons que la préparation de l'ADN mononucléosomal et de l'ADN génomique purifié a été faite par Marc Larochelle (laboratoire du Dr Luc Gaudreault, Université de Sherbrooke).

J'ai ensuite procédé au marquage indirect de l'ADN grâce à la trousse *BioPrime® Plus Array CGH Indirect Genomic Labeling System* (Invitrogen). Ce marquage est basé sur l'incorporation de nucléotides modifiés lors d'une amplification par l'enzyme de Klenow en présence d'amorces aléatoires et l'incorporation subséquente des fluorophores Alexa Fluor 647 et 555. Le matériel a été hybridé sur des puces à ADN Agilent de conception personnalisée. Ces puces contenaient 244 000 sondes d'environ 50 nt couvrant environ le quart du génome de *S. cerevisiae*, soient les chromosomes I, III, VI, VIII, XII et XIV, à raison d'environ une sonde à tous les 10 nt d'ADN. Notons que pour des raisons techniques, j'ai dû limiter l'étude à environ le quart du génome, même si à l'origine, je voulais étudier les modifications des nucléosomes sur l'ensemble du génome.

Tel qu'illustré à la figure 16, le profil nucléosomal obtenu est hautement reproductible au sein d'une même souche. Cela signifie que la méthode et les conditions choisies sont adaptées à la recherche de différences subtiles de profil nucléosomal entre les deux souches de levures. Pour être considérée valable, une différence entre les souches ne doit pas être expliquée par la variabilité entre les répliquats. Heureusement, les coefficients de corrélation entre les répliquats sont élevés : 0,93 pour la souche W303 et 0,91 pour la souche *htz1Δ*.

Dans l'ensemble, les profils de nucléosomes obtenus ressemblent à ceux publiés par d'autres groupes (Lee et al., 2007; Yuan et al., 2005). Le promoteur du gène *SNT1* est un exemple représentatif des promoteurs contenant une région NFR bordée de nucléosomes bien positionnés. Mes résultats pour les souches W303 et *htz1Δ* montrent bien la présence du NFR et des nucléosomes bien positionnés. Si, pour la région du promoteur, mes résultats

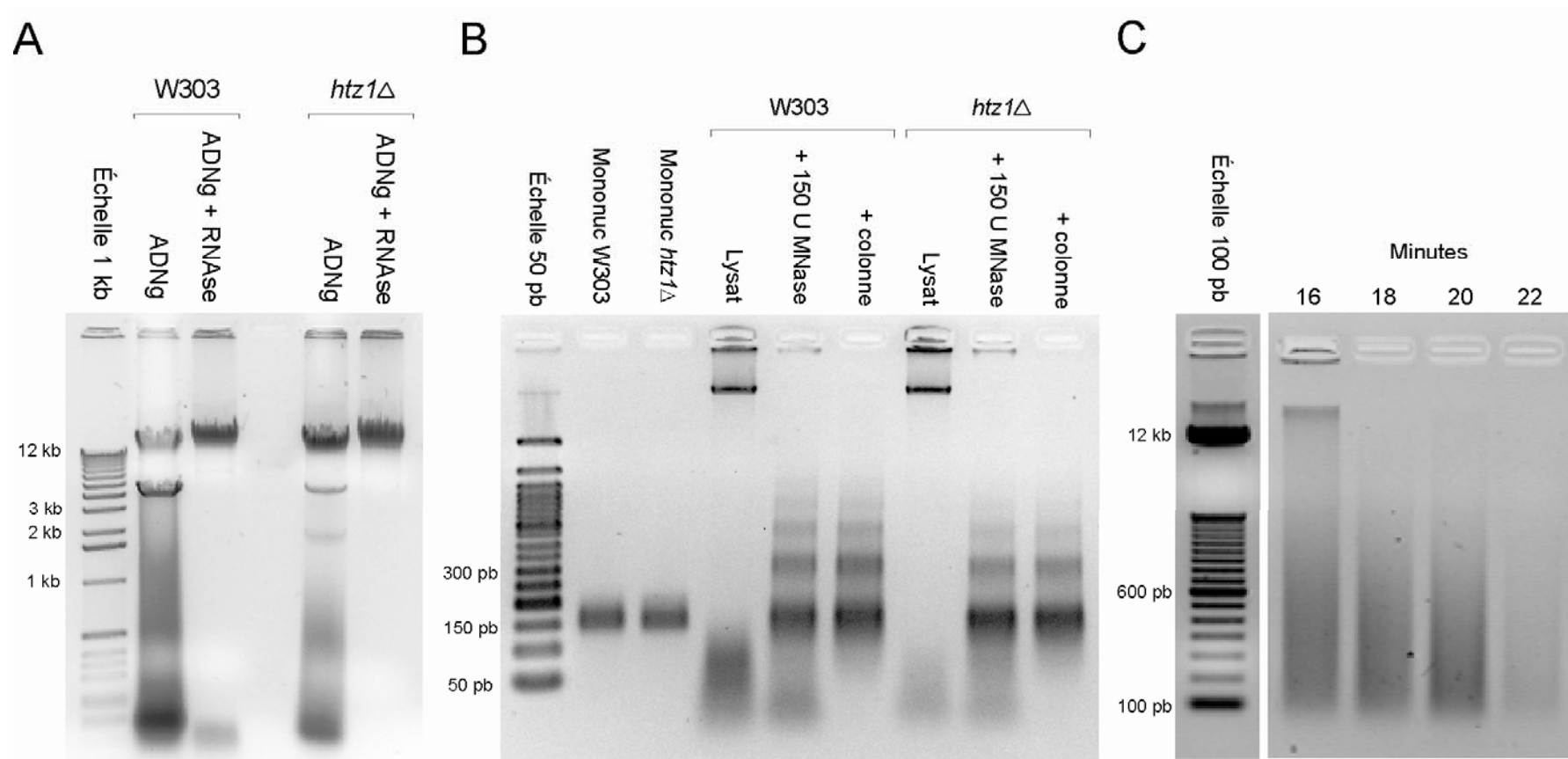


Figure 15. Isolation et digestion de l'ADN par la MNase afin de déterminer la position des nucléosomes.

A) Isolation de l'ADN génomique (ADNg) des souches W303 et *htz1Δ*. Les échantillons avant et après purification par la RNase sont montrés. Noter que la digestion de l'ARN de l'échantillon W303 est incomplète (puit #3). B) Isolation de l'ADN mononucléosomal des souches W303 et *htz1Δ*. De gauche à droite : ADN mononucléosomal (mononuc) purifié sur gel, lysat nucléaire non digéré, lysat nucléaire digéré par la MNase (des mono, di, trinucleosomes (etc.) sont visibles), lysat digéré après purification sur colonnes qiaQuick afin d'éliminer les fragments de 100 pb et moins. C) Digestion de l'ADN génomique digéré par 0,074 U de MNase pour générer un contrôle d'ADN possédant des tailles de 100 à 600 pb en majorité.



Figure 16. Concordance de la position des nucléosomes entre les deux répliquats des souches W303 et *htz1*Δ.

Représentation graphique de l'enrichissement des séquences nucléosomales dans la région environnant le promoteur de *SNT1*. L'enrichissement est représenté par une échelle logarithmique (\log_2). H2A.Z : Enrichissement de l'histone H2A.Z par rapport à H2B déterminé par ChIP-chip ((Guillemette et al., 2005). Yuan 2005 et Lee 2007 : Positions des nucléosomes de souches sauvages (déjà publiées) déterminées par MNase-chip. W303 et *htz1*Δ : mes données de positions des nucléosomes dans deux répliquats d'une souche sauvage (W303) et d'une souche H2A.Z (*htz1*Δ) déterminées par MNase-chip.

sont semblables à ceux publiés, on remarque une différence importante pour la région codante du gène *SNT1*. Selon mes résultats, les nucléosomes y sont déplétés, alors que selon les données publiées, ils y sont toujours présents mais moins bien définis. Ce résultat surprenant sera repris plus loin.

Par ailleurs, l'observation manuelle des données en parcourant le génome dans le fureteur de UCSC ne m'a pas permis de détecter des différences significatives entre les deux souches. Le promoteur *SNT1* en est un bon exemple, puisque les nucléosomes y occupent les mêmes positions, la taille du NFR est identique, le nombre de nucléosomes bien positionnés entourant le NFR est le même, etc.

Afin de détecter des différences de façon systématique, j'ai construit un programme comparant les valeurs d'enrichissement entre les réplicats et entre les souches pour chaque coordonnée chromosomique. Ce programme avait pour but de fournir la liste des coordonnées dont la différence entre les souches dépassait un certain seuil, en autant que les différences entre chaque paire de réplicats soient inférieures à une autre valeur déterminée. Les valeurs de seuils ont été choisies arbitrairement, mais ont été optimisées pour récupérer les différences jugées convaincantes à l'observation tout en écartant les coordonnées possédant une grande variabilité intra-souche.

Les résultats fournis par le programme ont été vérifiés par inspection visuelle et 26 coordonnées ont été retenues. Douze exemples représentatifs sont montrés à la figure 17. Des 6 coordonnées où l'on observe le déplacement d'un nucléosome situé à proximité du NFR dans le promoteur d'un gène, 4 sont illustrées. Pour les gènes *BNA5* et *YCL045C*, le nucléosome déplacé est celui situé juste en aval du NFR (Fig. 17 I et K), alors que pour les gènes *YLR456W* et *TOM22*, il s'agit de celui situé juste en amont du NFR (Fig. 17 J et L). Ces résultats sont intéressants puisqu'ils ressemblent au déplacement d'environ 10 pb d'un nucléosome du promoteur de *GALI* observé par Guillemette et ses collègues (Guillemette et al., 2005). Il se pourrait donc que mes résultats appuient l'hypothèse voulant que H2A.Z régule l'activité de certains promoteurs en y influençant la position des nucléosomes. De plus, on peut remarquer que dans la souche W303, H2A.Z est situé à l'intérieur ou à proximité du nucléosome déplacé dans la souche *htz1Δ* (voir la 1ère piste au haut de chaque panneau). Si l'absence de H2A.Z a un effet sur les nucléosomes, il est rationnel de croire

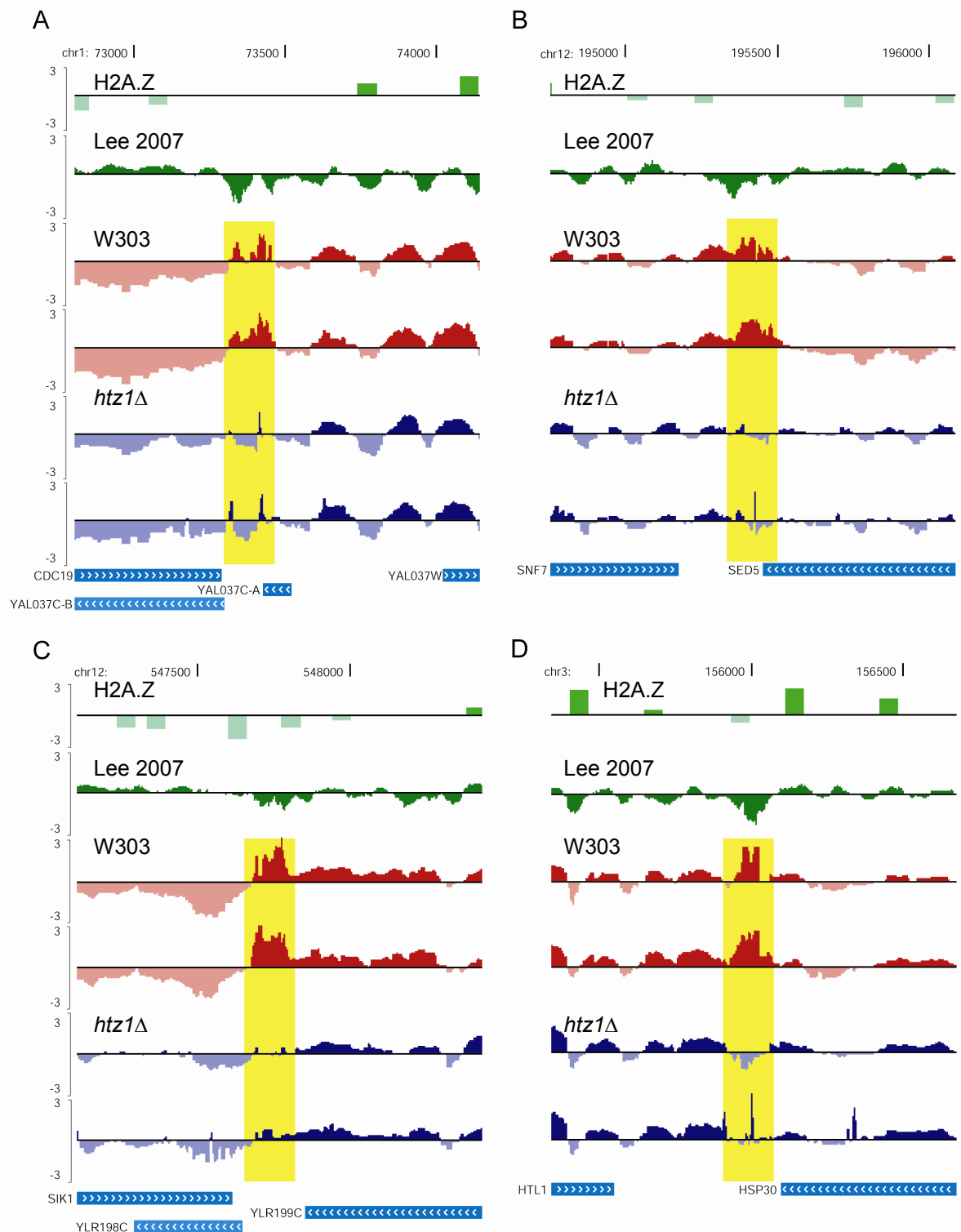


Figure 17. La délétion de H2A.Z entraîne la disparition ou le déplacement de certains nucléosomes.

A, B, C, D) Disparition du premier nucléosome situé en 3' de la séquence codante des gènes *CDC19*, *SED5*, *SIK1/YLR199C* et *HSP30*. Voir la légende de la figure 16 pour le détail des pistes montrées.

que c'est le nucléosome contenant normalement H2A.Z qui sera affecté, ou encore les nucléosomes avoisinants. Les résultats des panneaux I à L sont cohérents avec cette idée.

Le panneau 17 H montre le seul cas répertorié de déplacement d'un nucléosome situé en 3' d'un gène (Fig. 17 H). Même si H2A.Z est présent à proximité, ce résultat fait contraste à ceux décrits précédemment, où les déplacements de nucléosomes survenaient dans un promoteur. Il ne s'agit toutefois pas de la seule différence observée en 3' d'un gène, puisque j'ai observé 5 cas de nucléosomes ayant une position mieux définie dans la souche *htz1Δ* et qui sont situés en aval d'un gène. Dans les 3 exemples montrés (Fig. 17 E, F et G), les deux nucléosomes qui semblent se chevaucher partiellement dans la souche W303 occupent une position distincte dans la souche *htz1Δ*. Le fait que les nucléosomes soient mieux positionnés dans la souche mutante et non dans la souche sauvage est surprenant. Rappelons que l'alignement des nucléosomes des promoteurs contenant H2A.Z ou non semble indiquer que H2A.Z aide à mieux y positionner les nucléosomes (Guillemette et al., 2005). Il faut toutefois garder en tête que les nucléosomes analysés par Guillemette et ses collègues étaient situés dans les promoteurs, alors que mes résultats impliquent des nucléosomes situés en aval des gènes.

En plus des déplacements, j'ai observé 6 cas de disparition d'un nucléosome situé immédiatement à la fin d'un gène, dont 4 exemples sont montrés (Fig. 17 A à D). Le changement entre la souche sauvage et le mutant est spectaculaire. L'enrichissement élevé fait place à une déplétion ou un enrichissement très faible lorsque H2A.Z est délété. L'interprétation de mes résultats est rendue difficile par leur comparaison à ceux du groupe Nislow (voir la piste en vert foncé) (Lee et al., 2007). La présence même d'un nucléosome en 3' des gènes *CDC19*, *SED5*, *SIK1/YLR199C* et *HSP30* dans la souche sauvage est questionnable puisque ces nucléosomes sont absents dans les données de Lee et al. Toutefois, on peut observer une série de cas où les données publiées ne ressemblent aucunement à mes données, que ce soit pour la souche W303 ou *htz1Δ* (voir Fig. 17H par exemple). Prudence est de mise dans la comparaison des deux banques de données. Je reviendrai sur ce sujet dans les prochains paragraphes.

Mes données ont été utilisées pour aligner les nucléosomes sur le site d'initiation de la transcription (TSS) dans 3 groupes de gènes séparés par leur enrichissement de H2A.Z au promoteur (Fig. 18). En comparant les alignements générés avec les données des souches W303 et *htz1Δ*, on n'observe pas de différence significative dans le profil nucléosomal. La délétion de H2A.Z ne semble pas affecter globalement la présence, la position et la mobilité des nucléosomes situés dans les promoteurs. Cela concorde avec le fait que j'ai observé peu de déplacements de nucléosomes en amont des gènes. Ces déplacements sont minoritaires par rapport aux situations où il n'y a aucun changement, et ne sont donc pas détectables dans l'alignement global. En comparant les profils de nucléosomes des promoteurs possédant beaucoup ou peu de H2A.Z (Fig. 18 A et C), on observe un résultat similaire à celui de Guillemette et ses collègues (Guillemette et al., 2005). Les nucléosomes situés dans les promoteurs contenant un niveau faible de H2A.Z semblent avoir une position moins bien définie autour du TSS que les promoteurs contenant un niveau élevé de H2A.Z (comparer A avec C).

D'autres alignements des nucléosomes ont été faits sur le codon d'initiation et de terminaison (séparément) dans les 6 groupes de gènes séparés par leur niveau de transcription, tels que définis à la figure 8 du chapitre 2. En ce qui concerne les résultats des souche W303 et *htz1Δ* (Fig. 19 A et B), on observe une corrélation inverse entre l'enrichissement des nucléosomes sur la séquence codante des gènes et leur niveau de transcription. En d'autres termes, les gènes plus fortement transcrits possèdent moins de nucléosomes que ceux faiblement transcrits. Cela est cohérent avec d'autres résultats publiés (Kristjuhan and Svejstrup, 2004; Lee et al., 2004; Schwabish and Struhl, 2004; Yuan et al., 2005), soutenant davantage l'idée que la transcription requiert et/ou crée une déplétion des nucléosomes sur l'ORF. On observe par contre que les gènes les plus faiblement transcrits (courbe violette) possèdent un faible niveau de nucléosomes. Ces gènes pourraient être maintenus dans un état d'hétérochromatine très compacte, rendant difficile la digestion par la MNase. C'est cette difficulté de générer de l'ADN mononucléosomal pour ces gènes qui pourrait expliquer le faible enrichissement observé. Contrairement aux alignements des nucléosomes sur le TSS (Fig. 18) et le codon d'initiation (Fig. 19) qui ne montrent pas de différence significative entre les souches W303 et *htz1Δ*, l'alignement sur le codon de terminaison (Fig. 19) montre un léger affaissement

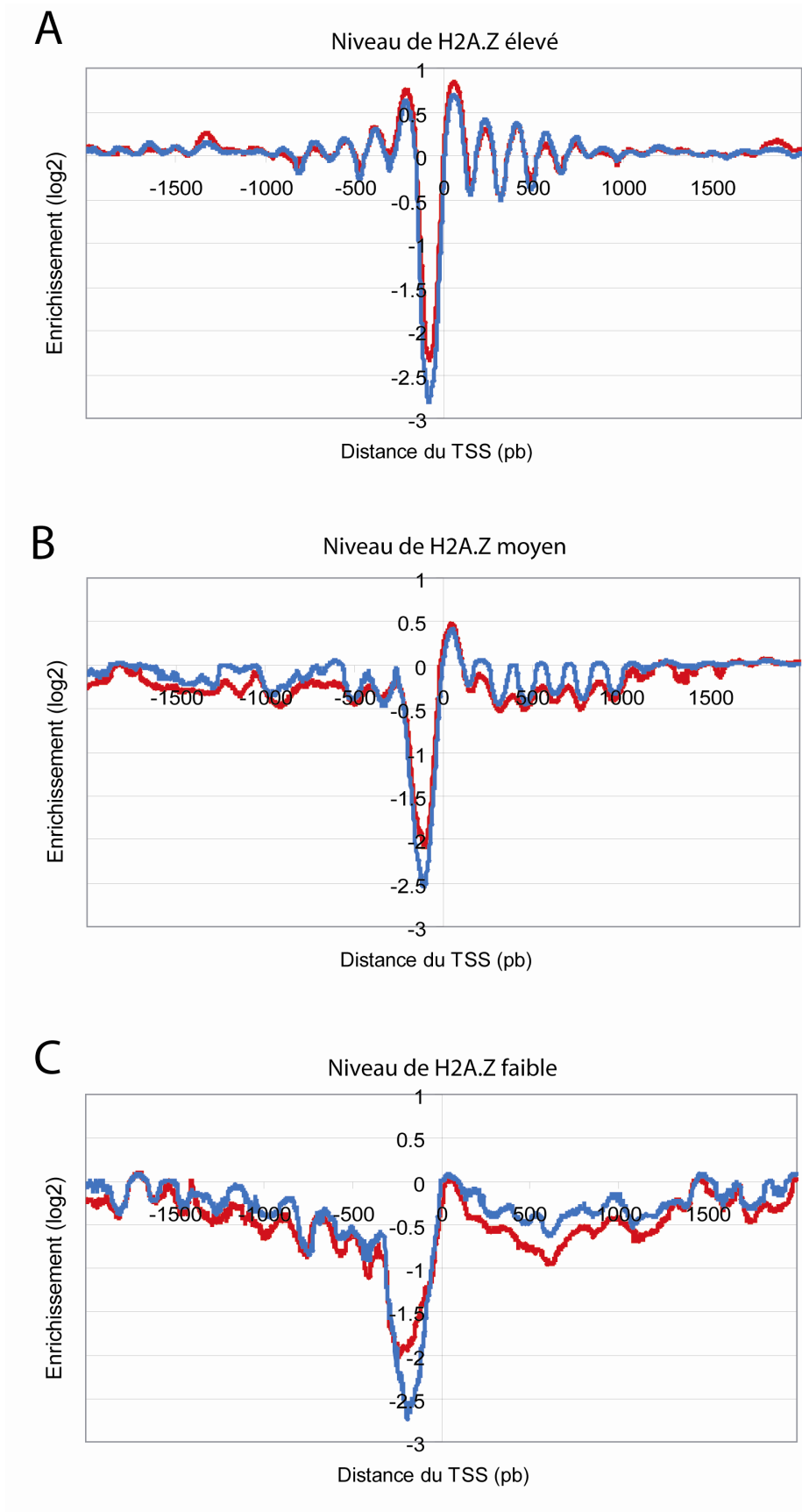


Figure 18.
Alignement des nucléosomes sur le site d'initiation de la transcription (TSS).

Les gènes de *S. cerevisiae* ont été divisés en six groupes en fonction de l'enrichissement médian de H2A.Z à leur promoteur. Trois groupes sont montrés : A) enrichissement supérieur à 2 (364 gènes), B) enrichissement entre 0 et 0,6 (390 gènes), C) enrichissement inférieur à -0,4 (136 gènes). Les profils des nucléosomes ont été alignés par rapport au site d'initiation de la transcription (TSS) (David et al., 2006) et une courbe moyenne a été générée. Les données de la souche W303 sont en rouge, alors que celles de la souche *htz1Δ* sont en bleu.

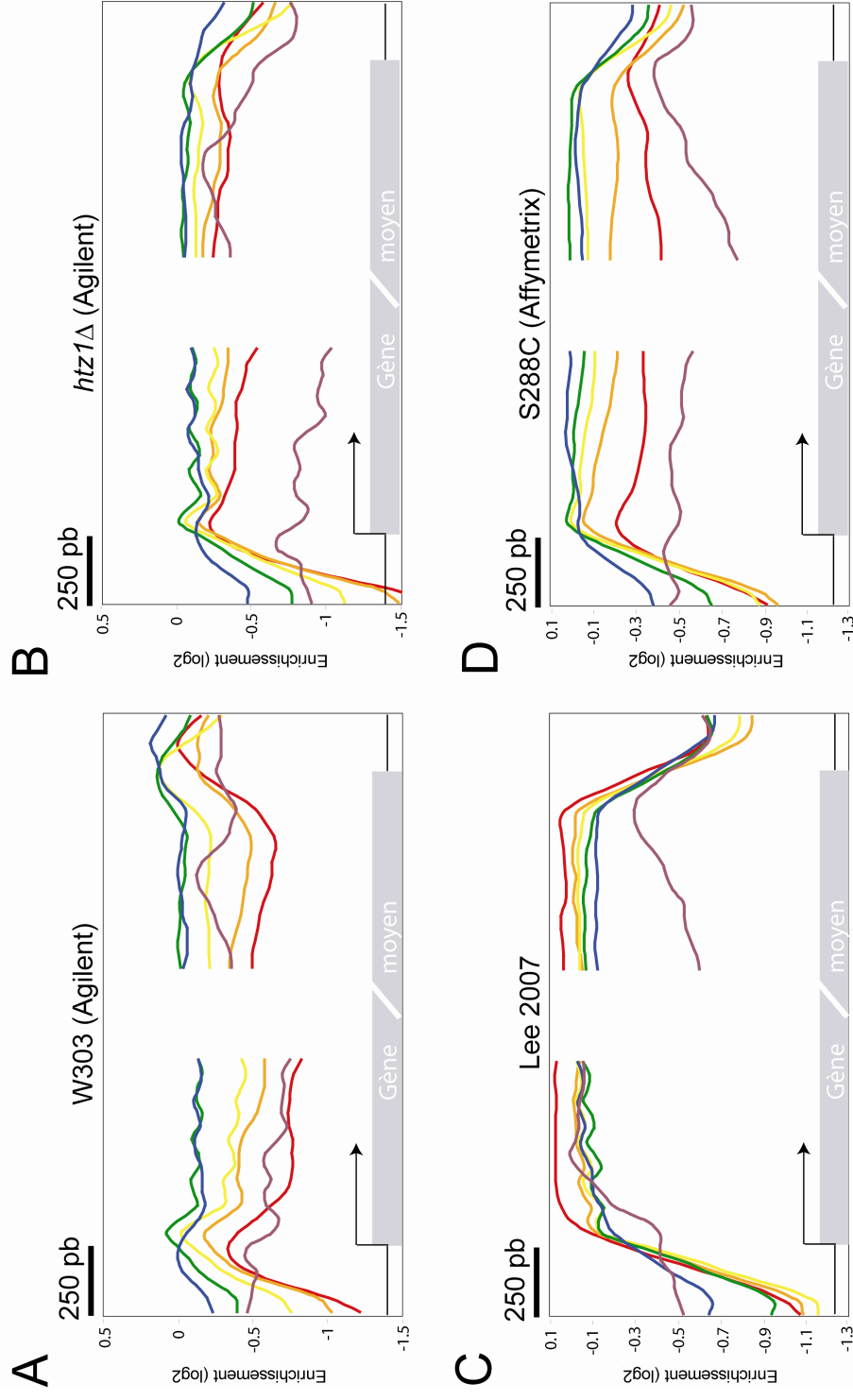


Figure 19. Corrélation directe et inverse entre la présence des nucléosomes sur l'ORF et le niveau de transcription.

Les 6 groupes de gènes définis par leur niveau de transcription (voir Fig. 8) ont été utilisés pour aligner les nucléosomes sur le codon d'initiation et de terminaison, et une courbe moyenne a été générée. L'ordre décroissant des niveaux de transcription est indiqué par le gradient de couleurs (rouge → bleu). A et B) L'ADN des souches W303 et *htz1*Δ a été préparé selon ma méthode et détecté avec la technologie Agilent. C) ADN préparé et détecté dans le laboratoire Nislow, avec la technologie Affymetrix. D) L'ADN d'une souche sauvage S288C a été préparé selon ma méthode et détecté par la technologie Affymetrix.

des courbes immédiatement en aval du gène. Ce résultat rappelle l'observation de six cas de disparition du premier nucléosome situé à la fin d'un gène, dont j'ai parlé précédemment. Ces six cas ne peuvent à eux seuls expliquer la diminution observée à la figure 19 (panneaux A et B). Il est possible qu'une baisse d'enrichissement soit généralement retrouvée à la fin des gènes, mais que je n'aie détecté que les exemples les plus significatifs.

Le même alignement a été fait avec des données publiées concernant une souche sauvage de type S288C (Lee et al., 2007). Étonnamment, la corrélation inverse entre la présence des nucléosomes et le niveau de transcription que j'ai observée (et qui est généralement acceptée par la communauté scientifique) est absente (Fig. 19C). Au contraire, on remarque une corrélation directe entre ces deux paramètres : les gènes plus transcrits possèdent une plus forte présence des nucléosomes sur l'ORF que les gènes moins transcrits. Pour vérifier si le type de souche de levure (W303 ou S288C) a une influence sur la corrélation observée dans l'alignement des nucléosomes, j'ai entrepris de localiser les nucléosomes dans une souche sauvage de provenance S288C et je les ai alignés de la même façon. Le résultat fut le même que ce que j'avais observé avec la souche W303 (non montré), indiquant que ce n'est pas l'utilisation d'une souche différente qui explique la divergence entre mon résultat et celui du groupe Nislow. L'autre hypothèse était celle de la méthode de préparation de l'ADN et la plate-forme de détection par puces à ADN. Lee et al. ont utilisé, en guise d'ADN contrôle, de l'ADN génomique digéré par la DNase I afin de générer des fragments de moins de 100 pb et en moyenne de 50 pb. De plus, ils ont fait appel à la technologie Affymetrix pour la détection de leurs séquences, en utilisant un protocole de marquage et d'hybridation adapté à cette plate-forme et qui diffère du protocole que j'ai utilisé. Pour déterminer quel paramètre entre la méthode de préparation et la plate-forme d'hybridation est responsable de la différence de résultats observée, j'ai envoyé mes propres échantillons de la souche S288C au groupe Nislow pour qu'ils soient détectés avec la technologie Affymetrix. Cette expérience a donné des résultats similaires à ceux que j'avais obtenus (Fig. 19D). Ainsi, la corrélation inverse entre présence des nucléosomes sur l'ORF et niveau de transcription est observée pour tous les échantillons que je prépare selon ma méthode, indépendamment de la plate-forme de détection (Fig. 19 A, B et D).

J'ai ensuite comparé les technologies Agilent et Affymetrix du point de vue de la reproductibilité et de l'exactitude des résultats. Les données fournies par la détection de mes échantillons sur la plate-forme Affymetrix (Fig. 20, pistes S288C), ont été comparées entre elles et avec mes données W303. Il s'avère que la plate-forme d'hybridation n'a pas d'impact sur la reproductibilité des résultats puisque les réplicats S288C possèdent un coefficient de corrélation de 0,91, soit le même coefficient que pour mes réplicats *htz1*Δ que j'ai analysés avec la plate-forme Agilent. À l'inverse, la méthode de préparation des échantillons influence la reproductibilité. En effet, les réplicats des données publiées par le groupe Nislow possèdent un coefficient d'environ 0,84. La position des nucléosomes semble être affectée par la plate-forme utilisée. En scrutant quelques régions du génome, je me suis rendu compte que les positions sont parfois identiques (Fig. 20A) et parfois très différentes (Fig. 20B) en comparant les résultats "Agilent" et "Affymetrix". Fait important, ces différences ne sont pas retrouvées uniquement dans la région codante des gènes (voir les résultats de corrélation directe et inverse décrits dans le paragraphe précédent), mais également dans leur promoteur, près du NFR.

En bref, j'ai déterminé que l'absence de H2A.Z entraîne des changements dans le profil des nucléosomes de *S. cerevisiae*. En analysant environ le quart du génome, j'ai répertorié 26 changements importants. Par ailleurs, j'ai découvert que la plate-forme de détection influence l'allure du profil des nucléosomes, mais pas la reproductibilité, alors que la méthode de préparation de l'ADN influence ces deux paramètres.

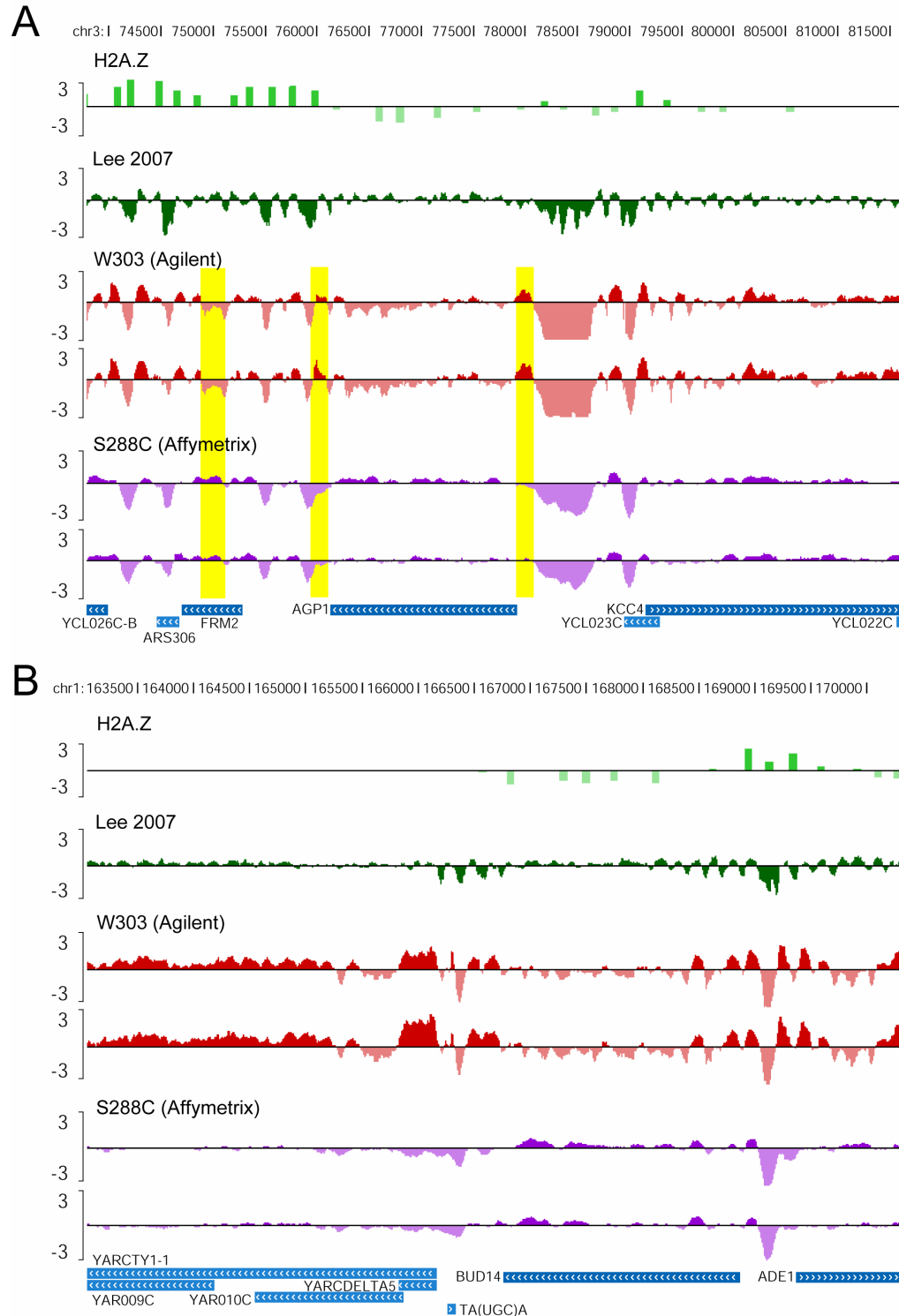


Figure 20. Comparaison des méthodes de marquage et des plate-formes d'hybridation.

L'ADN mononucléosomal des souches W303 et S288C a été préparé selon ma méthode, puis détectés avec les plate-formes Agilent et Affymetrix, respectivement. A) Les résultats S288C sont reproductibles et ressemblent aux résultats W303, bien que des différences soient visibles (jaune). B) Le profil nucléosomal S288C montre des différences importantes par rapport au profil W303.

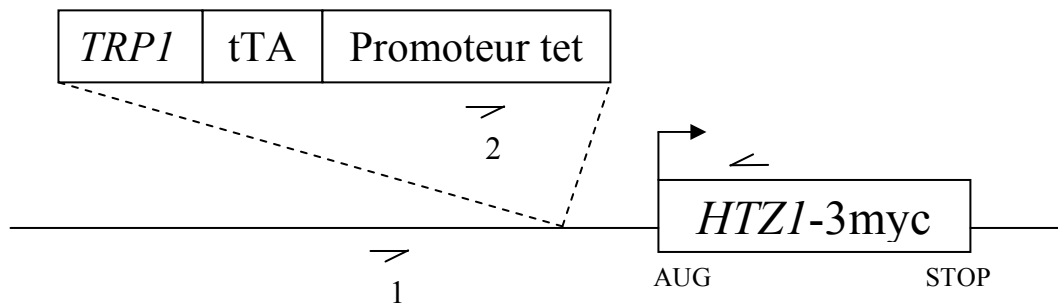
4. Résultats : dynamique d'incorporation de H2A.Z dans la chromatine

Nos connaissances sur le complexe protéique permettant l'échange de H2A par H2A.Z et sur le mécanisme utilisé pour y parvenir ont évolué depuis quelques années. Cependant, nous ignorons les détails temporels et spatiaux de cet assemblage de H2A.Z dans la chromatine. Nous possédons les outils nécessaires à ces investigations. Le ChIP-chip permet de localiser H2A.Z dans le génome et la synchronisation des cellules de levure permet d'investiguer son cycle cellulaire. La difficulté réside cependant dans la nécessité de discerner les histones incorporées au moment étudié de celles qui ont été incorporées durant une autre phase du cycle cellulaire, voire même plusieurs générations avant. Pour pallier à ce problème et fournir plus de souplesse dans l'élaboration des expériences, j'ai construit une souche de levure dont l'expression de H2A.Z peut être réprimée ou induite par l'ajout ou le retrait de la doxycycline, respectivement.

Le promoteur endogène du gène *HTZI* a été remplacé par un promoteur *CYC1* contenant deux sites de liaison pour le transactivateur tTA, dont la séquence codante a elle aussi été insérée dans le génome. Ce transactivateur est une fusion de l'activateur VP16 du virus Herpes simplex et du répresseur tetR de l'opéron Tn10 de *E. coli* qui régule la résistance à la tétracycline (Gari et al., 1997). En absence de tétracycline, tTA active la transcription du gène dont le promoteur contient ses séquences de liaison. La tétracycline et ses analogues (ex : la doxycycline) inhibent le transactivateur tTA et entraînent la répression du gène.

Le remplacement du promoteur a été fait selon le principe utilisé pour construire la souche Rpb1-9myc (Chapitre 2), soit la recombinaison homologue d'un fragment amplifié par PCR. Les colonies issues de la transformation ont été criblées par PCR pour identifier les intégrations correctes du fragment (Fig. 21). Pour deux transformants positifs, j'ai vérifié la répression de H2A.Z par la doxycycline et sa production, bien que légèrement supérieure à la normale, en l'absence du composé (Fig. 22). Les deux transformants ont donné les résultats attendus, soit la forte répression de H2A.Z et son expression à un niveau près de la normale, selon la répression ou l'induction. Le transformant #1 a été sélectionné et sera nommé "tet-*HTZI*-3myc". J'ai étudié la vitesse de croissance par spectrophotométrie pour vérifier que la souche tet-*HTZI*-3myc se comportait comme une souche *htz1Δ* en présence

A



B

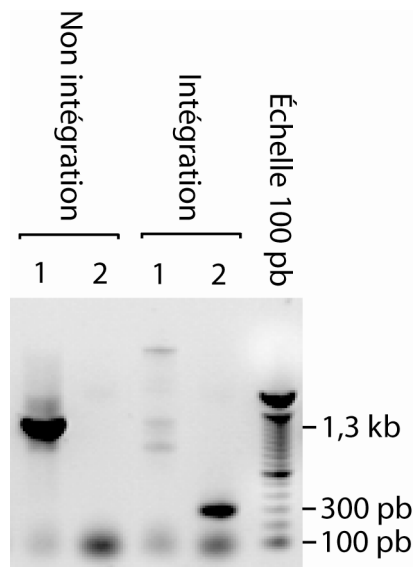


Figure 21. Criblage de l'intégration correcte du promoteur tet en amont du gène *HTZ1*.

A) Schéma illustrant l'intégration du fragment contenant le gène *TRP1*, la séquence codante du transactivateur tTA et le promoteur tet. Les demi-flèches indiquent la position des amorces ayant servi à cribler l'intégration.

B) Deux réactions de PCR ont été effectuées pour chaque transformant : une réaction donnant une bande de 1,3 kb en absence d'intégration et de 6,2 kb en présence d'intégration (en utilisant l'amorce 1 du panneau A), et une réaction ne donnant aucun produit en absence d'intégration et une bande de 291 pb en présence d'intégration (amorce 2). La figure montre un exemple de non intégration et un exemple d'intégration, avec les bandes de tailles attendues dans chaque cas.

de doxycycline et comme une souche sauvage en absence de doxycycline. Tel qu'attendu, la souche tet-*HTZI-3myc* avait une vitesse de croissance normale en absence de doxycycline, et une vitesse de croissance inférieure en présence de ce composé.

J'ai ensuite voulu caractériser plus en détail l'induction de l'histone. Je voulais déterminer la quantité de H2A.Z présente dans le cytoplasme/nucléoplasme et dans la chromatine à différents temps suite au retrait de la doxycycline. J'ai donc développé une méthode d'isolation de la chromatine par ultracentrifugation (Fig. 23), en utilisant une souche où H2A.Z est exprimé normalement par son promoteur endogène. Le lysat cellulaire total a été centrifugé à 315 000 g pendant 1 heure afin de faire précipiter la majorité des fragments d'ADN. Tel que montré à la figure 23A, une partie de l'ADN (surtout les fragments de plus petites tailles) reste dans le surnageant, mais la majorité est précipitée. Un *Western blot* a révélé que les histones H2A.Z, H2B et H4 étaient présentes en grande majorité dans le culot (Fig. 23B). En fait, seule H2A.Z était détectée légèrement dans le surnageant.

Une fois cette méthode de fractionnement mise au point, j'ai pu procéder à la caractérisation de l'induction de H2A.Z. La souche tet-*HTZI-3myc* a été cultivée en présence de doxycycline jusqu'à la phase de croissance exponentielle. La culture a été centrifugée et resuspendue dans un milieu frais ne contenant pas de doxycycline pour permettre la synthèse de H2A.Z et des aliquotes ont été prélevées pendant une période atteignant 300 minutes.

L'histone a été quantifiée dans le lysat cellulaire avant centrifugation, dans le surnageant et dans le culot par *Western blot* (Fig. 24). L'histone commence à être détectée après 40 minutes dans le lysat total et le culot, indiquant qu'elle est incorporée dans la chromatine dès son expression. Rappelons cependant que cette expérience a été faite avec une culture de cellules asynchrones, c'est-à-dire une culture de composition hétérogène où toutes les phases du cycle cellulaire sont représentées. Ce résultat n'implique donc pas que H2A.Z peut être incorporée à la chromatine au même moment du cycle cellulaire où elle est produite. La quantité de H2A.Z dans le lysat total semble atteindre un plateau après 3 heures. L'intensité des bandes détectées est alors similaire à celle de la souche *HTZI-3myc*, où H2A.Z est sous le contrôle de son promoteur endogène. Cela est cohérent avec l'observation que la quantité de la protéine H2A.Z est limitée par la cellule, même si la

transcription de son gène dépasse les besoins normaux (Adam et al., 2001). Contrairement à l'histone H4, j'ai détecté des quantités appréciables de H2A.Z dans le surnageant, seulement pour la souche tet-*HTZ1-3myc*. Cela ne peut pas être dû à une saturation des espaces disponibles pour incorporer H2A.Z dans la chromatine, puisque la quantité de H2A.Z dans la chromatine pour la souche tet-*HTZ1-3myc* est à tout moment inférieure à la normale (souche *HTZ1-3myc*). Il est possible que les histones H2A.Z présentes dans le surnageant sont celles qui n'ont pas été produites au moment approprié pour être incorporées. La production de H2A.Z atteint son maximum au début de la phase G2. Si seules les histones produites à ce moment peuvent être incorporées, celles synthétisées en d'autres moments dans la souche tet-*HTZ1-3myc* vont se retrouver dans le surnageant.

La souche tet-*HTZ1-3myc*, qui permet de contrôler la synthèse de l'histone H2A.Z, constitue un outil permettant d'étudier l'incorporation de cette histone dans la chromatine. En raison de contraintes de temps, je n'ai pu exploiter le plein potentiel de cette souche, mais j'ai tout de même généré un résultat qui laisse croire que les moments de la synthèse de H2A.Z et de son incorporation ne sont pas laissés au hasard. Cependant, l'expérience montrée à la figure 24 n'a été effectuée qu'une seule fois. Il faut donc rester prudent dans l'interprétation de ces résultats. Il sera essentiel de refaire cette expérience pour s'assurer que des niveaux significatifs de H2A.Z sont présents dans le surnageant après environ 90 minutes.

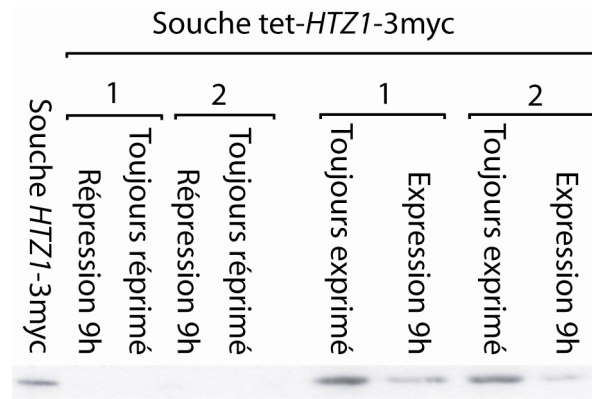
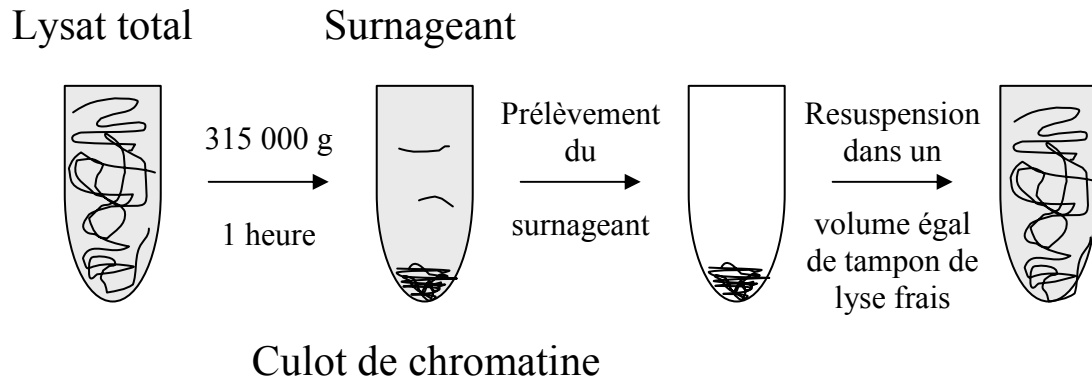


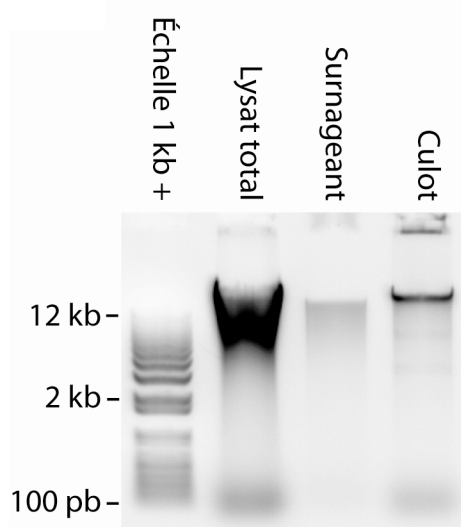
Figure 22. Répression et induction de H2A.Z dans la souche tet-*HTZ1-3myc*.

Deux transformants (1 et 2) ayant une intégration correcte du promoteur tet ont été analysés par *Western blot* pour vérifier la répression et l'induction de H2A.Z. La souche tet-*HTZ1-3myc* a été cultivée en milieu YPD et YPD + doxycycline pour démontrer l'expression et la répression, respectivement. Différentes combinaisons de milieux ont été testées en effectuant une première culture de 16 heures suivie d'une seconde culture de 9 heures dans un milieu frais. La figure montre l'absence de H2A.Z après une répression de 9 heures (YPD → YPD+dox), résultat aussi observé pour une répression constante (YPD+dox → YPD+dox). À l'inverse, le niveau de H2A.Z après 9 heures d'expression (YPD+dox → YPD) est appréciable, mais plus faible qu'après une expression constante (YPD → YPD). Un dosage des protéines a permis de vérifier que des quantités égales de protéines totales ont été chargées dans tous les puits. En plus du résultat de la présente figure, d'autres résultats de *Western blot* (non montrés) ont confirmé la répression totale de H2A.Z en présence de doxycycline et la levée de cette répression lors du passage à un milieu de culture dépourvu de doxycycline.

A



B



C

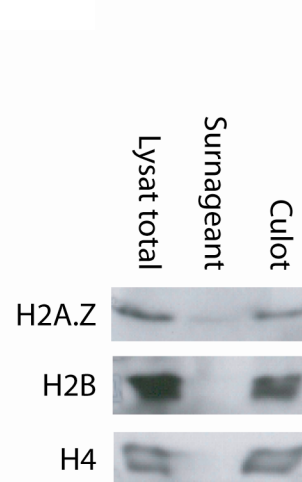


Figure 23. Isolation de la chromatine par ultracentrifugation.

Une ultracentrifugation d'une heure à 315 000 g a permis de séparer le lysat cellulaire de levures en deux fractions : le cytoplasme/nucléoplasme (surnageant) et la chromatine (culot). A) Schéma illustrant les étapes de l'isolation de la chromatine. B) Le contenu en ADN a été vérifié sur gel d'agarose. C) Les histones H2A.Z, H2B et H4 ont été détectées par *Western blot*. Puisque la majorité des protéines totales a été précipitée lors de l'ultracentrifugation, il était impossible d'utiliser un dosage des protéines totales pour normaliser l'intensité du signal en *Western blot*. Nous avons cependant resuspendu le culot de chromatine dans un volume égal de tampon de lyse pour éviter une variation de l'intensité du signal causée par un facteur de dilution.

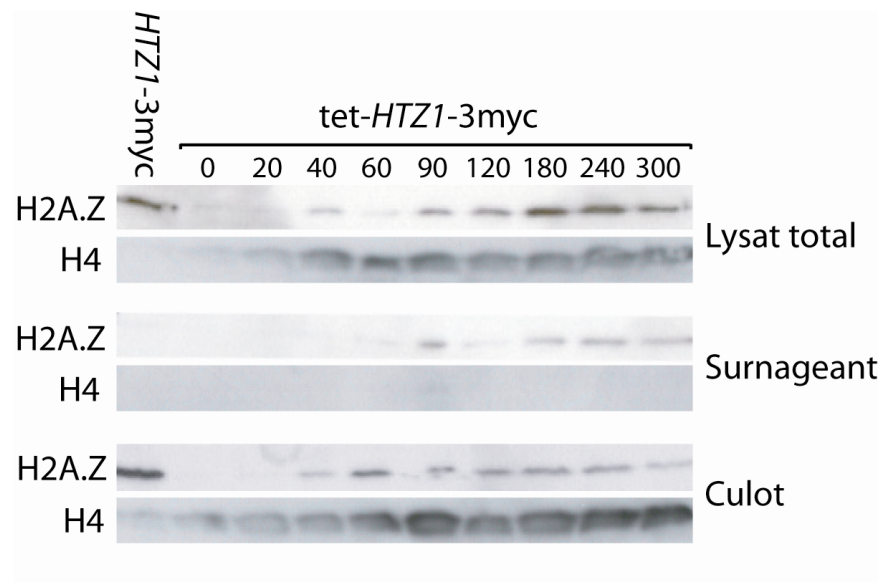


Figure 24. Incorporation de H2A.Z à la chromatine suite à son induction dans la souche tet-*HTZ1-3myc*.

À différents temps après l'arrêt de la répression de H2A.Z par la doxycycline (de 0 à 300 minutes), des aliquotes d'une culture de la souche tet-*HTZ1-3myc* ont été prélevées et la quantité de H2A.Z-3myc a été analysée dans le lysat total, le cytoplasme/nucléoplasme (surnageant) et la chromatine (culot) par *Western blot*. L'histone H4 a elle aussi été détectée comme contrôle. Un dosage des protéines a permis de vérifier que des quantités égales de protéines totales ont été chargées dans tous les puits d'une même rangée (Lysat total, Surnageant ou Culot).

5. Discussion

5.1 Localisation génomique des isoformes phosphorylées de l'ARN polymérase II

J'ai étudié par ChIP-chip le patron de phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II à l'ensemble des gènes. Mon approche bioinformatique a permis d'identifier peu de gènes où l'on retrouve une exception dans le patron de phosphorylation par rapport au modèle classique. Cela suggère que la majorité des gènes de *S. cerevisiae* sont transcrits de façon semblable, du moins en ce qui a trait à la phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II. On peut désormais affirmer que les quelques résultats de ChIP-qPCR publiés précédemment représentaient bien l'ensemble du génome.

Au départ, mon algorithme d'identification des gènes exceptionnels m'a permis d'identifier de nombreuses exceptions (plusieurs dizaines de gènes dans la plupart des catégories d'exception). Je n'ai pu trouver de caractéristiques communes à ces gènes (numéro de chromosome, distance au télomère, longueur et niveau de transcription). En éliminant les gènes dont l'exception pouvait être facilement expliquée par l'environnement immédiat (ex : présence d'un gène transcrit à proximité), la liste de gènes exceptionnels fut réduite à 17 candidats, toutes catégories confondues. Jusqu'à maintenant, seules les exceptions des gènes *TSAI* et *HPT1* ont été confirmées par qPCR. Dans les prochaines lignes, je vais considérer que les autres exceptions existent réellement, en gardant en tête qu'elles devront aussi être confirmées par qPCR.

Les gènes *BSCI* et *GITI* sont les deux seuls cas où l'on observe une absence d'enrichissement par l'anticorps 8WG16 alors que l'enrichissement par c-Myc est normal. Cela pourrait se produire si la capacité d'immunoprécipiter la polymérase était réduite uniquement avec l'anticorps 8WG16 (et non c-Myc) aux gènes *BSCI* et *GITI*. Il se peut qu'une protéine liant le CTD de l'ARN Pol II à ces gènes empêche l'interaction correcte entre le CTD et 8WG16 uniquement. En effet, 8WG16 et c-Myc ont des cibles différentes. 8WG16 reconnaît les répétitions non phosphorylées du CTD, alors que c-Myc reconnaît les 9 copies de l'épitope myc qui sont situées en C-terminal du CTD. Alternativement, ce résultat pourrait être expliqué par une distribution différente des répétitions non phosphorylées. Il

se pourrait qu'aux gènes *BSC1* et *GIT1*, le niveau total de phosphorylation soit semblable aux autres gènes, mais que ce ne soit pas les mêmes répétitions du CTD qui soient phosphorylées. La reconnaissance par 8WG16 serait altérée, mais pas celle de c-Myc, dont la reconnaissance est indépendante de l'état de phosphorylation. Quoi qu'il en soit, l'utilisation de l'anticorps 8WG16 pour les gènes *BSC1* et *GIT1* est inappropriée, car elle laisse croire que ces gènes ne sont pas transcrits dans les conditions de culture utilisées. Si on écarte ces deux gènes, 8WG16 donne un profil semblable à celui de c-Myc. On peut donc conclure que l'utilisation de 8WG16 est généralement appropriée pour l'immunoprécipitation de l'ARN Pol II chez la levure.

Le gène *URA8* est le seul cas où l'on observe un enrichissement de 8WG16 et c-Myc uniquement dans la partie 5' du gène. Ce profil est similaire à celui des gènes où la polymérase est en pause au promoteur chez les eucaryotes supérieurs. Il se peut qu'il existe bel et bien de la pause au promoteur chez *S. cerevisiae*. Par contre, les gènes où l'on observe la pause représentent une part importante du génome chez les eucaryotes supérieurs. Il s'agit d'un mécanisme très utilisé pour contrôler la transcription des gènes. Dans mes expériences, je n'ai découvert qu'un seul exemple possible de pause au promoteur. Il faut donc rester prudent avant de conclure que ce phénomène existe chez *S. cerevisiae*.

J'ai trouvé 9 gènes présentant l'une des situations suivantes : niveau faible de phosphorylation de Ser-2, absence de cette phosphorylation ou apparition tardive de cette phosphorylation. Étonnamment, 7 gènes sur 9 possèdent un intron. Si l'on se rappelle que l'épissage des introns est couplé à la transcription grâce à la phosphorylation du CTD, il est intéressant de penser que des événements d'épissage peuvent empêcher la reconnaissance du CTD par l'anticorps H5, même si les autres anticorps ne semblent pas affectés. Alternativement, il est possible que la transcription de certains gènes possédant un intron ne requiert pas la phosphorylation de Ser-2 telle qu'observée aux autres gènes.

Enfin, j'ai répertorié 5 gènes où la phosphorylation de Ser-5 est faible ou inexistante. Puisque ce type de phosphorylation est requis pour le relâchement de l'ARN Pol II du promoteur, il pourrait exister, à ces gènes, un mécanisme différent de relâchement du promoteur qui ne nécessiterait pas la phosphorylation de Ser-5. Rappelons également que

l'ajout de la coiffe en 5' de l'ARNm se fait lorsque le CTD est phosphorylé en Ser-5. Il serait intéressant de voir si la stabilité de ces ARNm est diminuée par absence de coiffe ou si la cellule a développé une voie alternative d'ajout de la coiffe pour ces ARNm.

Somme toute, le profil de phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II semble le même pour la très grande majorité des gènes de *S. cerevisiae*. J'ai détecté plusieurs exceptions, dont la majorité a été expliquée par le contexte : présence d'autres gènes à proximité ou gènes chevauchants, faible longueur du gène, etc. Ce résultat montre l'importance de connaître l'environnement du gène d'intérêt lorsque des études d'immunoprécipitation sont effectuées. La banque de données générée permettra donc de diminuer les probabilités de biais techniques pour de futures études. J'ai également répertorié quelques gènes où l'on observe un profil de phosphorylation du CTD exceptionnel, sans que le contexte ou l'environnement ne soit en cause. D'autres expériences devront être faites pour expliquer ces exceptions.

5.2 Implication de H2A.Z dans le positionnement des nucléosomes

J'ai localisé les nucléosomes dans environ le quart du génome d'une souche de levure sauvage et d'une souche *htz1Δ*. Pour des raisons techniques, il n'a pas été possible d'utiliser des biopuces incluant le gène *GALI*. La position de deux nucléosomes du promoteur de *GALI* a été déterminée à très haute résolution par une technique de MNase-LMPCR, à la fois dans une souche sauvage et une souche *htz1Δ* (Guillemette et al., 2005). Il aurait été intéressant de comparer les positions de ces nucléosomes à celles que j'aurais obtenues par MNase-chip. J'aurais ainsi pu valider si la technique que j'ai utilisée donne des positions exactes, en plus de tester sa capacité de détecter des variations subtiles de positions, comme observé au gène *GALI*. J'ai néanmoins été capable de détecter de faibles déplacements de nucléosomes à d'autres loci, indiquant que cette méthode était bien adaptée pour ce type d'étude. J'ai détecté des déplacements faibles de nucléosomes situés dans des régions promotrices. Ces résultats rappellent ce qui a été observé au gène *GALI* (Guillemette et al., 2005) et laissent croire qu'il existe bien un mécanisme de positionnement des nucléosomes impliquant H2A.Z.

J'ai aussi répertorié quelques cas où des nucléosomes situés en aval d'un gène occupent une position mieux définie dans le mutant *htz1Δ*. Compte tenu de la littérature publiée, il aurait été logique d'observer le résultat inverse : une meilleure définition dans la souche sauvage. J'ignore actuellement la signification de ce résultat.

J'ai également observé plusieurs cas de disparition du nucléosome situé en aval d'un gène dans le mutant *htz1Δ*. Il se peut que H2A.Z soit requise pour ancrer le nucléosome situé immédiatement en 3' du gène. Même si H2A.Z est reconnue pour être située dans le promoteur et non dans la région terminatrice, il est possible qu'elle exerce son action « à distance ». Il existe une différence entre la distance calculée en nucléotides (si l'on considère l'ADN comme un fil en deux dimensions) et la distance réelle (en considérant l'ADN comme une molécule en trois dimensions). En effet, deux régions situées à plusieurs kilobases de distance peuvent être à proximité dans la cellule lorsque l'ADN se replie. Des évidences montrent que la portion 3' d'un gène peut être réunie à la portion 5', formant une boucle, ce qui permettrait à plusieurs cycles de transcription de se produire sans arrêt (Saiz and Vilar, 2006). Ce phénomène de *looping* pourrait expliquer comment une altération de la chromatine pourrait être influencée par H2A.Z même si cette histone se retrouve à plusieurs centaines de nucléotides. Ces résultats sont intéressants puisqu'il n'existe pas actuellement de données supportant l'idée que le nucléosome situé immédiatement en 3' du gène joue un rôle quelconque. Mes données pourraient conduire à la découverte d'un nouveau rôle pour ce nucléosome. Par exemple, celui-ci pourrait servir à freiner la polymérase vers la fin du gène et participer à la terminaison de la transcription. La vérification de la longueur de l'ARNm aux gènes concernés dans les souches sauvage et mutante permettrait de vérifier cette hypothèse.

La comparaison de l'alignement des nucléosomes sur le TSS dans un groupe de promoteurs possédant un niveau élevé de H2A.Z et dans un groupe possédant un niveau faible de H2A.Z montre un résultat semblable à celui de Guillemette et ses collègues (Guillemette et al., 2005), soit des positions mieux définies dans le premier groupe (Fig. 18 A et C). Les auteurs ont suggéré que l'absence de H2A.Z dans le deuxième groupe était responsable de la moins bonne définition des courbes d'alignement. À l'aide de mes résultats, nous

pouvons désormais observer l'effet de la disparition de H2A.Z au sein d'un même groupe (voir Fig. 18 A, courbes rouge et bleue). On n'observe pas de différence importante entre les deux courbes. Ce résultat va à l'encontre de l'idée que H2A.Z influence globalement la position des nucléosomes aux promoteurs. Il se peut que le résultat observé entre les groupes « avec » et « sans » H2A.Z (Fig. 18 A et C) soit dû à un autre paramètre que la présence ou l'absence de H2A.Z. Les cas de déplacement de nucléosome décrits jusqu'à maintenant sont peut-être des cas isolés. Il faut être prudent avant d'associer une fonction aux changements observés (déplacement, disparition et mobilité de nucléosomes). D'ailleurs, le nombre de cas détectés reste faible, en considérant que le quart du génome a été étudié.

J'ai analysé les niveaux de nucléosomes sur l'ORF des gènes dans différents groupes définis par leur niveau de transcription. J'ai observé une corrélation inverse entre la présence des nucléosomes et le niveau de transcription, à l'opposé de ce que le groupe Nislow a publié (Lee et al., 2007). J'ai déterminé que c'est la méthode de préparation de l'ADN qui est responsable de cette divergence. En considérant que des groupes de chercheurs arrivent à des conclusions opposées selon le protocole utilisé, on doit se poser la question : « Quel résultat représente le mieux la réalité ? » Cette question est importante puisqu'elle remet en doute notre conception selon laquelle le passage de la polymérase sur l'ORF éjecte les nucléosomes. Même si j'ai observé que ma méthode de préparation de l'ADN est plus reproductible que celle du groupe Nislow, on ne peut prétendre qu'elle est la plus exacte. La question reste donc ouverte.

J'ai également obtenu des résultats différents du groupe Nislow, en ce qui concerne la position des nucléosomes à l'extérieur des ORF. Dans ce cas, il semble que la méthode de préparation de l'ADN et la plate-forme de détection utilisées influencent toutes deux les résultats. Encore une fois, il est difficile de déterminer quels résultats sont exacts. Je peux cependant affirmer que mes résultats de positions des nucléosomes sont d'une grande importance puisqu'ils indiquent qu'on ne peut pas nécessairement se fier aux positions publiées par Lee et ses collègues (Lee et al., 2007).

Deux conclusions importantes sont à tirer de mes expériences. D'abord, j'ai montré pour la première fois que des changements de profil nucléosomal sont causés par l'absence de

H2A.Z ailleurs qu'au gène *GALI*. Ces résultats devront être confirmés par une deuxième méthode, comme la MNase-LMPCR (telle qu'utilisée par Guillemette et al.). Enfin, la méthode de préparation de l'ADN et la plate-forme d'hybridation a une grande influence sur les résultats obtenus. Cela devrait être pris en compte dans de futures expériences.

5.3 Dynamique d'incorporation de H2A.Z dans la chromatine

J'ai construit une souche de levure dont l'expression de H2A.Z peut être réprimée par l'ajout de doxycycline. En caractérisant l'incorporation de H2A.Z dans la chromatine, à l'aide de cultures asynchrones, j'ai observé une différence importante entre la souche répressible (*tet-HTZ1-3myc*) et la souche normale (*HTZ1-3myc*). On observe, uniquement pour la souche *tet-HTZ1-3myc*, un niveau appréciable de H2A.Z dans le surnageant (nucléoplasme/cytoplasme). Il est possible que H2A.Z doive être produite à un moment déterminé pour être incorporée, et que les histones H2A.Z présentes dans le surnageant soient celles qui ont été produites à l'extérieur de ce moment déterminé dans la souche *tet-HTZ1-3myc*.

Une façon simple de tester cette hypothèse serait de vérifier si H2A.Z peut être produite et incorporée à la chromatine dans des levures arrêtées à différents moments du cycle cellulaire par l'ajout d'un composé chimique dans le milieu de culture. Il existe trois composés qui, lorsque ajoutés dans le milieu de culture, permettent de synchroniser les levures en arrêtant leur cycle cellulaire : l'alpha-factor, l'hydroxyurée et le nocodazole. Les trois composés arrêtent le cycle cellulaire en phases G1, S et G2/M, respectivement (Futcher, 1999). L'hydroxyurée serait toutefois inappropriée puisque les levures déficientes en H2A.Z sont sensibles à ce composé (Larochelle and Gaudreau, 2003). Heureusement, il existe une autre méthode pour synchroniser les cellules au début de la phase S de manière réversible : l'utilisation d'une souche portant une allèle thermosensible de Cdc7, une kinase essentielle à l'initiation de la réplication. Il serait donc possible de vérifier si H2A.Z peut être incorporée si elle est synthétisée en phase G1, en phase S ou encore en phase G2/M. Compte tenu du résultat que j'ai obtenu, je m'attendrais à ce que H2A.Z ne puisse être incorporé qu'à l'un ou l'autre de ces moments du cycle, ou encore à aucun des trois Dans

un tel cas, il serait intéressant de lever le blocage du cycle cellulaire pour déterminer à quel moment du cycle cellulaire H2A.Z peut être incorporée.

En bref, d'autres expériences devront être effectuées pour mieux comprendre la dynamique d'incorporation de H2A.Z à la chromatine. J'ai développé une souche de levure dont la synthèse de H2A.Z peut être contrôlée. L'utilisation conjointe de cette souche et des outils permettant d'étudier le cycle cellulaire chez la levure mènera sans doute à des découvertes intéressantes sur cet aspect encore peu étudié de l'histone H2A.Z.

6. Matériel et méthodes

6.1 Localisation de l'ARN polymérase II par CHIP-chip

6.1.1 Immunoprécipitation de la chromatine

Pour les anticorps 8WG16, H14 et H5, la souche sauvage de *S. cerevisiae* "W303" a été utilisée. *Notez que j'utilise l'alias « W303 » pour désigner ma souche sauvage. En réalité, W303 désigne la provenance ou les antécédents d'une souche (background). Le lecteur remarquera dans la section 6.11 que plusieurs souches partagent la même provenance « W303 » car elles ont été construites par modification génétique de la même souche sauvage.* Pour l'anticorps c-Myc, les souches Rpb1-9myc et W303 ont été utilisées. Dans chaque expérience, deux réplicats biologiques indépendants ont été cultivés jusqu'à la phase de croissance exponentielle dans des conditions standard (milieu YPD, 30°C, sous agitation). Du formaldéhyde (1% final) a été ajouté directement aux cultures, et celles-ci ont été agitées à 21°C pendant 30 min. Les cellules ont été lavées trois fois dans 40 ml de tampon TBS froid, puis trempées brièvement dans l'azote liquide avant d'être décongelées sur glace. 700 µl de tampon #1 et 1 g de billes de verre ont été ajoutés, et les cellules ont été lysées par 4 cycles d'agitation de 5 min (agitateur Mini Beadbeater 96+) espacés de 5 min de repos sur glace. La chromatine a été soniquée durant 4 cycles de 20 s (sonicateur : Fisher Model 100 Sonic Dismembrator réglé à la puissance 1,2) espacés d'une minute de repos sur glace. L'immunoprécipitation a été réalisée en agitant à 4°C pendant 16 heures 500 µl du lysat cellulaire avec 50 µl de billes magnétiques couplées à l'anticorps approprié. La préparation des billes magnétiques (le jour précédent l'immunoprécipitation) a nécessité deux lavages dans le tampon PBS+BSA et l'agitation à 4°C pendant 16 heures en présence d'une quantité déterminée d'anticorps dilués dans le tampon PBS+BSA. Les quantités d'anticorps sont : 2 µl de 8WG16, 2 µl de c-Myc (Dr R. Young), 5 µl de H14 et 5 µl de H5. Les billes magnétiques Dynabeads M-450 Pan Mouse IgG ont été utilisées pour les anticorps 8WG16, H14 et c-Myc, alors que les billes Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG ont été utilisées pour H5. Dans la chambre froide, les billes ont été lavées deux fois avec 1 ml des tampons #1, #2 et #3 (dans l'ordre), puis une fois avec 1 ml de tampon TE. Les billes ont été resuspendues dans 50 µl de tampon TE/SDS et incubées à 65°C durant 16

heures. Dans les expériences où le lysat total jouait le rôle de contrôle, 5 µl de lysat ont été dilués dans 50 µl de tampon TE/SDS et incubés de la même manière. Le surnageant contenant l'ADN a été traité par 350 µl de mélange de RNase à 37°C pendant 2 heures. 15 µl de SDS 10% puis 7,5 µl de protéinase K ont été ajoutés avant d'incuber 2 heures à 37°C. Deux extractions au phénol/chloroforme/alcool isoamylique ont précédé une précipitation à l'éthanol (du NaCl a été ajouté à 200 mM avant l'ajout de 2,5 volumes d'éthanol). L'ADN a été resuspendu dans 50 µl de tampon TE.

6.1.2 Préparation du matériel pour la détection sur puce à ADN

De ce 50 µl, 40 µl ont été incubés 20 min à 12°C en présence de 70 µl de mélange de polymérisation (noter que pour le contrôle de type "lysate total", 2 µl du 50 µl ont été dilués dans 40 µl d'eau pour obtenir une concentration d'ADN semblable à celle obtenue par immunoprécipitation de la chromatine). L'ADN a été purifié une fois de plus par extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique et précipitation à l'éthanol (300 mM d'acétate de sodium et 82 µg/ml de glycogène ont été ajoutés avant l'ajout d'éthanol). L'ADN a été resuspendu dans 25 µl d'eau et 25 µl de mélange de ligase (contenant les adaptateurs) ont été ajoutés avant une incubation de 16 heures à 16°C. L'ADN a été précipité à l'éthanol (300 mM d'acétate de sodium), resuspendu dans 25 µl d'eau et combiné à 15 µl de mélange de marquage. Le LM-PCR a été lancé et 10 µl de mélange d'enzymes ont été ajoutés durant la première étape à 55°C. Les produits du PCR ont été purifiés par la trousse Qiaquick PCR purification en remplaçant les tampons PE et EB par les tampons #4 et #5 respectivement. L'ADN a été séché à l'aide d'un *speed-vac*, resuspendu dans 4,5 µl de tampon carbonate frais et coloré en présence de 4,5 µl du fluorophore approprié (Cy5 ou Cy3) à 21°C pendant 1 heure dans l'obscurité. Après l'ajout de 35 µl d'acétate de sodium 100 mM, l'ADN a été repurifié sur colonnes Qiaquick avec les tampons du fabricant. Les échantillons "enrichi" et "contrôle" ont été combinés, concentrés au *speed-vac* et mélangés à 110 µl de solution d'hybridation. Chaque échantillon a été dénaturé 3 min à 95°C et transféré à 40°C jusqu'à l'hybridation sur l'un des quatre carreaux d'une lame Agilent 4x44k. Après incubation de 16 à 24 heures à 40°C sous agitation, les lames ont été lavées 5 min dans les solutions de lavage A et B. Le signal a été détecté à l'aide d'un numériseur GenePix 4000.

6.2 Localisation de l'ARN polymérase II par ChIP-qPCR

Le protocole d'immunoprécipitation de la chromatine a été suivi tel que décrit (section 6.1.1). Seuls les anticorps c-Myc, H14 et H5 ont été utilisés. L'ADN immunoprécipité a été dilué d'environ un facteur 10. Pour chaque lot d'ADN contrôle (un lot par immunoprécipitation), une dilution a été effectuée afin que la concentration de l'ADN immunoprécipité soit égale à celle de l'ADN contrôle correspondant. Dans ce cas, le signal généré pour l'amplification du gène contrôle *ARNI* sera égal. Pour déterminer la bonne dilution, j'ai étudié la variation du signal d'amplification de *ARNI* en fonction de la dilution d'ADN contrôle et j'ai intrapolé la valeur de dilution idéale. L'amplification a été effectuée à l'aide de la trousse QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen) et du thermocycleur Mx3005P (Stratagene). L'enrichissement a été calculé selon la méthode du $\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen, 2001). Le cycle d'amplification correspondant au début de l'amplification exponentielle (Ct) a été calculé pour chaque condition. Les valeurs de Ct des régions cibles ont été normalisées par celles du contrôle *ARNI*. La différence entre les Ct de l'ADN contrôle et de l'ADN enrichi a été calculée et convertie en enrichissement. Les réactions de qPCR ont été faites en duplicata techniques pour un réplicat biologique uniquement. L'analyse des courbes de dissociation a confirmé la spécificité de l'amplification.

6.3 Localisation des nucléosomes par MNase-chip

6.3.1 Préparation de l'ADN mononucléosomal

La souche sauvage W303 et la souche mutante *htz1* Δ ont été cultivées et fixées comme en 6.1.1, avec les modifications suivantes : 450 ml de culture, 2% de formaldéhyde, un seul lavage dans 50 ml d'eau froide. Les cellules ont été resuspendues dans 39 ml de tampon #6 et 10 mg de Zymolyase ont été ajoutés. Le tout a été incubé à 28°C sous agitation jusqu'à ce que la densité optique diminue à 5% de sa valeur initiale. Le culot de sphéroblastes a été resuspendu dans 600 μ l de tampon #7 et digéré avec 150 U de MNase à 37°C pendant 20 min. Une unité (U) équivaut à la quantité d'enzyme nécessaire pour augmenter l'absorbance d'une unité à 260 nm suite à l'hydrolyse d'ADN en nucléotides. 150 μ l de solution Stop #1 et 6 μ l de protéinase K ont été ajoutés avant une incubation de 16 heures à

65°C. Une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique a précédé une précipitation à l'isopropanol (300 mM d'acétate de sodium ont été ajoutés avant l'ajout d'un volume d'isopropanol). L'ADN a été resuspendu dans 60 µl de tampon NEBuffer 2 dilué 1/10 et traité par 50 µg de RNase A pendant 2 heures à 37°C. L'ADN mononucléosomal a été séparé sur gel d'agarose 2% et purifié par la trousse BioRad Freeze-N-Squeeze.

6.3.2 Préparation de l'ADN génomique

Des sphéroblastes ont été préparés pour les souches W303 et *htz1Δ* tel que décrit dans les premières étapes de la section 6.3.1, en omettant la fixation au formaldéhyde. Les sphéroblastes ont été resuspendus dans 3 ml de tampon #9, 300 µl de SDS 10% ont été ajoutés et le tout a été incubé 30 min à 65°C. Après l'ajout de 1 ml d'acétate de potassium 5M, les échantillons ont été mis au repos sur glace 60 min et centrifugés. L'ADN du surnageant a été précipité à l'éthanol (aucun sel ajouté, 1 volume d'éthanol) et resuspendu dans 300 µl de tampon TE avant de traiter par 150 µg de RNase A à 37°C pendant 1 heure. Finalement, une extraction au phénol/chloroforme et une précipitation à l'isopropanol (150 mM NaOAc, 3 volumes d'isopropanol) ont été effectuées.

6.3.3 Digestion de l'ADN génomique par la MNase

De 10 à 15 µg d'ADN génomique ont été digérés avec 0,037 unité de MNase à 37°C dans le tampon #10. Un gradient de digestion a été obtenu en prélevant des aliquotes de 15 à 30 min, en leur ajoutant 10 µl de solution Stop #2 et en extrayant rapidement au phénol/chloroforme/alcool isoamylique. L'ADN a été précipité à l'éthanol (200 mM NaCl, 2,5 volumes d'éthanol), resuspendu dans du tampon TE et migré sur gel d'agarose 2% pour vérifier la taille des fragments digérés.

6.3.4 Marquage de l'ADN en vue de la détection

2 µg d'ADN mononucléosomal et d'ADN génomique digéré ont été marqués à l'aide de la trousse *BioPrime® Plus Array CGH Indirect Genomic Labeling System*. Les échantillons marqués ont été hybridés tel que décrit en 6.1.2, à l'exception que des puces à ADN Agilent de conception personnalisée ont été utilisées. Ces puces contenaient 244 000 sondes d'environ 50 nt couvrant environ le quart du génome de *S. cerevisiae*, soient les chromosomes I, III, VI, VIII, XII et XIV, à raison d'environ une sonde à tous les 10 nt d'ADN.

6.4 Construction des souches de levure

6.4.1 Souche *RPBI-9myc*

Le fragment à intégrer au génome de la souche W303 a été amplifié à partir du plasmide RY7445, avec les oligos #1 et #2. Les levures compétentes ont été transformées par environ 20 µg du fragment par la méthode de transformation à l'acétate de lithium (Becker and Lundblad, 2001). Les transformants ont été sélectionnés sur gélose YNB sans tryptophane. Ceux-ci ont été cultivés en milieu liquide et lysés tel que décrit en 6.1.1. Une partie du lysat a été purifiée par extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique et précipitation à l'éthanol, afin d'effectuer un PCR pour cribler les intégrations correctes au génome. Les oligos #3 et #4, ciblant respectivement l'ORF de *RPBI* et le gène *TRP1* du fragment intégré, ont été utilisés. L'autre partie du lysat a été analysée par *Western blot* (voir la section 6.6 pour les conditions générales). Les anticorps primaires c-Myc (Santa Cruz, dilution : 300) et 8WG16 (dilution : 1000) ont été utilisés en combinaison avec l'anticorps secondaire Goat Anti-Mouse IgG -HRP Conjugate (dilution : 1000).

6.4.2 Souche tet-*HTZI-3myc*

Le fragment à intégrer au génome de la souche *HTZI-3myc* a été amplifié à partir du plasmide pCM182, contenant le gène marqueur *TRP1*, une séquence centromérique (CEN4), la séquence codante du répresseur tTA et le promoteur tet. La séquence CEN4 a été omise en amplifiant séparément les deux régions situées de part et d'autre puis en réunissant ces deux régions dans une étape finale de PCR recombinant. Les oligos #5 et #6 ont amplifié le gène *TRP1*, les oligos #7 et #8 ont amplifié le répresseur tTA et le promoteur tet, puis les oligos #5 et #8 ont servi à réunir les deux fragments lors du PCR final. Le protocole de transformation a été décrit en 6.4.1. Les transformants ont été sélectionnés sur gélose YNB sans tryptophane. Les intégrations correctes ont été vérifiées par PCR, avec les paires d'oligos #9 + #10 et #9 + #11.

6.5 Induction de H2A.Z dans la souche tet-*HTZI-3myc*

Le mutant tet-*HTZI-3myc* a été cultivé en milieu YPD + 1 µg/ml doxycycline pour réprimer la synthèse de H2A.Z. Pour vérifier la levée de la répression, les cellules ont été

centrifugées, resuspendues dans un milieu YPD frais et cultivées dans des conditions normales. Les cellules prélevées à différents moments ont été lysées par *bead beating* (voir section 6.1.1) et l'apparition de H2A.Z-3myc dans les différentes fractions cellulaires a été vérifiée par *Western blot*. Trois fractions cellulaires ont été analysées : le lysat cellulaire total, la fraction soluble et la chromatine. La chromatine a été séparée de la fraction soluble par centrifugation à 315 000 g pendant 1 heure. La détection de H2A.Z-3myc a été faite avec l'anticorps c-Myc (Santa Cruz, dilution : 500) en combinaison avec l'anticorps secondaire Goat Anti-Mouse IgG -HRP Conjugate (dilution : 10 000). Les anticorps ont été éliminés des membranes par *stripping*, tel que décrit dans le cahier d'information de la trousse de détection ECL. Les membranes ont ensuite été réhybridées avec l'anticorps anti histone H4 (dilution : 1000) en combinaison à l'anticorps secondaire Goat Anti-Rabbit IgG -HRP Conjugate (dilution : 3000). La démonstration de l'isolation de la chromatine par ultracentrifugation (Fig. 23) a été faite avec une souche dont l'histone H2B a été fusionnée à l'épitope Flag. L'anticorps Anti-Flag (Sigma, dilution : 1000) a alors été utilisé en combinaison avec l'anticorps secondaire Goat Anti-Mouse IgG -HRP Conjugate.

6.6 Conditions générales utilisées en *Western blot*

Les protéines ont été dosées à l'aide de la trousse Bio-Rad Protein Assay. Elles ont été mélangées à ½ volume du tampon Laemmli 3X, puis chauffées à 95°C pendant 5 minutes pour permettre leur dénaturation. Elles ont ensuite subi une migration sur gel de polyacrylamide dénaturant à 120 V pendant 1h30, puis ont été transférées sur membrane de nitrocellulose à 30 V pendant 16h à 4°C. La membrane a été incubée 1 heure dans la solution de blocage et 1 heure dans la solution de blocage contenant l'anticorps primaire. Suite à 3 lavages de 5 min dans le tampon TBS-T, elle a été incubée 1 heure dans la solution de blocage contenant l'anticorps secondaire. Une autre série de lavages a précédé la détection du signal de chimiluminescence à l'aide de la trousse ECL plus (Amersham) et de films photographiques Hyperfilm ECL.

6.7 Composition des tampons, solutions et mélanges

Tampon #1

50 mM HEPES-KOH pH 7,5
140 mM NaCl
1 mM EDTA
1% Triton X-100
0,1% désoxycholate de sodium
1 mM PMSF
1 mM Benzamidine
10 µg/ml Aprotinine
1 µg/ml Leupeptine

Tampon #2

Idem tampon #1, sauf 500 mM NaCl

Tampon #3

10 mM Tris-HCl pH 8,0
250 mM LiCl
0,5% NP40
0,5% désoxycholate de sodium
1 mM EDTA

Tampon #4

5 mM KPO₄ pH 8,5
80% éthanol

Tampon #5

4 mM KPO₄ pH 8,5

Tampon #6

1 M sorbitol
50 mM Tris HCl pH 7,4
10 mM 2-mercaptoéthanol

Tampon #7

1 M sorbitol
50 mM NaCl
10 mM Tris pH 7,4
5 mM MgCl₂
1 mM CaCl₂
500 µM spermidine
1 mM 2-mercaptoéthanol
0,075% NP40

Tampon #9

50 mM Tris-HCl
50 mM EDTA pH 8,0

Tampon #10

15 mM Tris HCl pH 8,0
50 mM NaCl
1,4 mM CaCl₂
0,2 mM EDTA pH 8,0
0,2 mM EGTA
5 mM 2-mercaptoéthanol

Tampon TBS

20 mM Tris-HCl pH 7,5
150 mM NaCl

Tampon PBS+BSA

0,2 g/L KCl
8 g/L NaCl
0,2 g/L KH₂PO₄
8 mM Na₂HPO₄
5 mg/ml BSA

Tampon TE

10 mM Tris HCl pH 8,0
1 mM EDTA

Tampon TE/SDS

10 mM Tris HCl pH 8,0
1 mM EDTA
1% SDS

Tampon carbonate

100 mM Na₂CO₃ pH 9,0

Solution d'hybridation

100 µl de tampon Dig Easy hyb
5 µl d'ARNt de levure 8 mg/ml
5 µl d'ADN de sperme de saumon 250 µg/ml

Solution de lavage A

6X SSPE
0,005% N-Lauroylsarcosine

Solution de lavage B

0,06X SSPE

Solution Stop #1

5% SDS
50 mM EDTA pH 8,0

Solution Stop #2

860 mM Tris HCl pH 8,8

69 mM EDTA pH 8,0

Mélange de RNase

345 µl tampon TE

3 µl RNase A 10 mg/ml

2 µl glycogène 20 mg/ml

Mélange de polymérisation57,8 µl H₂O

11 µl tampon NEBuffer 2 10X

0,5 µl BSA 10 mg/ml

0,5 µl de mélange de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 20 mM chacun)

0,2 µl T4 DNA polymérase 3 U/µl

Mélange de ligase8 µl H₂O

10 µl tampon de ligase 5X

6,7 µl de mélange d'adaptateurs

0,5 µl de T4 DNA ligase

Mélange d'adaptateurs

15 µM oligo #17

15 µM oligo #18

250 mM Tris HCl pH 7,9

* Les oligos sont hybridés lors d'un passage lent de 95°C à 4°C

Mélange de marquage7,75 µl H₂O

4 µl de tampon ThermoPol 10X

2 µl de mélange aa-dUTP dNTP

3,3 µM oligo #17

Mélange aa-dUTP dNTP

5 mM dATP

5 mM dCTP

5 mM dGTP

3 mM dTTP

2 mM aminoallyl-dUTP

Mélange d'enzymes8 µl H₂O

1 µl de tampon ThermoPol 10X

1 µl Taq polymerase

0,01 µl PFU polymerase

Tampon Laemmli 3X

0,24 M Tris HCl pH 6,8
6% SDS
30% (v/v) glycérol
16% (v/v) 2-mercaptoéthanol
0,06% bleu de bromophénol

Gel de polyacrylamide dénaturant

a) Gel de compression (4%)
3,89% acrylamide
0,11% bisacrylamide
0,126 M Tris HCl pH 6,8
0,1% SDS
0,05% persulfate d'ammonium
0,1% TEMED

b) Gel de séparation (10%)
9,73% acrylamide
0,27% bisacrylamide
0,375 M Tris HCl pH 8,8
0,1% SDS
0,05% persulfate d'ammonium
0,05% TEMED

Tampon de migration

0,3% Tris base
1,44% glycine
0,5% SDS

Tampon de transfert

0,3% Tris base
1,44% glycine
20% méthanol

Tampon TBS-T

20 mM Tris-HCl pH 7,5
150 mM NaCl
1% Tween-20

Solution de blocage

20 mM Tris-HCl pH 7,5
150 mM NaCl
1% (v/v) Tween-20
5% lait en poudre

6.8 Provenance du matériel et des réactifs

	Fournisseur	No. de catalogue
<u>Anticorps</u>		
8WG16	Abcam	ab817
c-Myc (9E10) ciblant un épitope séquentiel (pour <i>Western blot</i>)	Santa Cruz	sc-40
c-Myc ciblant un épitope conformationnel (pour ChIP) *	Dr Richard A. Young	
H14	Covance	MMS-134R-500
H5	Covance	MMS-129R-200
Anticorps anti-H4	Dr Alain Verreault	
Anticorps anti-Flag	Sigma	F3165
Anti-Mouse IgG -HRP Conjugate	Bio-Rad	170-6516
Goat Anti-Rabbit IgG -HRP Conjugate	Bio-Rad	170-6515
<u>Enzymes</u>		
Micrococcal Nuclease (MNase)	Roche	107 921
PFU polymerase	Fermentas	EP0502
Protéinase K	Gibco	25530-049
T4 DNA polymerase	NEB	M0203L
T4 DNA ligase	Gibco	15224-041
Taq polymerase	Gibco	18038-240
Zymolyase-100T	MP Biomedical	8320932
<u>Réactifs</u>		
Acétate de sodium 3M	Sigma	S7899
ADN de sperme de saumon	Sigma	D-7656
Aminoallyl-dUTP	Ambion	AM8439
ARNt de levure	Invitrogen	15401
BSA	Roche	735 094
Cy5	Amersham	PA25001
Cy3	Amersham	PA23001
Dynabeads M-450 Pan Mouse IgG	Gibco	110.41
Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG	Gibco	110.42
Glycogène	Roche	10901393001
NP40	Amersham	US19628
NEBuffer 2	NEB	B7002S
N-lauroylsarcosine	Sigma	61743
Phénol/chloroforme/alcool isoamylique	Sigma	P-2069

Phénol/chloroforme	Sigma	P 1944
SSPE 20X	Invitrogen	15591
Tampon de ligase 5X	Gibco	46300-018
Tampon ThermoPol 10X	NEB	B9004S
Tampon Dig Easy Hyb	Roche	11603558001
<u>Trousses</u>		
Bioprime plus array CGH Indirect labeling system	Invitrogen	18096-011
Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns	Bio-Rad	732-6165
Qiaquick PCR purification	Qiagen	28106
QuantiTect SYBR Green PCR	Qiagen	204145
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad	500-0006
ECL plus western blotting detection reagents	Amersham	RPN2132
<u>Varia</u>		
Billes de verre	Sigma	G-8772
Lames Agilent 4x44k	Agilent	G4493A
Numériseur GenePix 4000	Axon Instruments	
Mini Beadbeater 96+	BioSpec Products	MBB-96
Sonicateur Model 100 Sonic Dismembrator	Fisher	15-338-53
Hyperfilm ECL	Amersham	28906838

*Pour le ChIP-chip, nous utilisons un anticorps préparé dans le laboratoire du Dr Young. Cet anticorps est de qualité supérieure en comparaison à l'anticorps 9E10 commercial, du moins pour les expériences de ChIP-chip.

6.9 Liste des oligonucléotides

1	ATTCTCCAAAGCAAGACGAACAAAAGCATAATGAAAATGAAAATTCAGATCCGGTTCT GCTGCTAG
2	AAACTATATATAATGTAATAACGTCAAATACGTAAGGATGATATACTATACCTCGAGGC CAGAAGAC
3	AGGCTACAGCCCAGGATCTC
4	TGTTACCAAATGCGATCGGTGTCG
5	TCGGAAAAATATCGTTAAATTCAATTCGCACTATAGCCGCACGTAAGAGAGGCCCTT TCGTCTTCAA
6	ATTCCTGGCCGTCGTTTTAGGCTGATGGTGTATGCAA
7	TTGCATAAACACCATCAGCCTAAAACGACGGCCAGTGAAT

8	CGCCGGATTTACCTTTACCTCCATGAGCTTTTCTGACATTATGTTAAGTGATCCCCCGA ATTGATCC
9	ATTACCAGCCAACTCCAGCA
10	AGTACAACATTCGCGGAACC
11	CACGCAAACACAAATACACACA
12	ATCGCCTAAAATCATACCAAATAAAAAGAGTGTCTAGAAGGGTCATATACGATTTCCG CCTATTGGTTA
13	ACTATATATTTGATATTTATATGCTATAAAGAAATTGTACTIONCAGATTTCC TCCATTTTGTAATTTTCGTGTCG
14	GAAGGTTGATGCCGTTTTGT
15	CAAAATTGTGATGGCTGCAT
16	TGAAGAGAAAGCACGTCGAG
17	GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC
18	GAATTCAGATC

Localisation de l'ARN Pol II par ChIP-qPCR

Gène	Région amplifiée	Amorce 1	Amorce 2
<i>TSAI</i>	1	ATTGTTGCACAGAGAGCAAGGGAC	TGGGTTCTTCCTCGTCAGGGATTA
	2	TCGACGGTGTCTTTGACGAAGTCT	TGGACAGACGAAAGTGAAGGCCAA
	3	TCGGTAGAAACGTTGACGAAGCCT	TTCAACGGTTGGCTTGATGGTAGC
	4	TCACTTTAGCTCTGTTGCTGCCCT	TTGACGCCCTTCCCAAAGAGGAAA
<i>HPT1</i>	1	TCCCACGCGAAGAAGATCTGTCAA	TGCTTGCTTGATGTTCCAGATGGC
	2	ACGTTCCCATAATGTCGGCAAACG	AATGAAACCACCACCACCAATGGC
	3	GCCGAAATGTTGAATGACAA	CATTGCCCTGTTCAATAGCC
	4	TGGACAGCAATAACCAGCGACTGT	AAGAGAACGGGCGTTGTAGTCAGT

6.10 Programmes d'amplification par PCR

LM-PCR

Nombre de cycles	Température (°C)	Temps
1	55	4 min
1	72	5 min
1	95	2 min
32	95	30 s
	55	30 s
	72	1 min
1	72	4 min

qPCR

Nombre de cycles	Température (°C)	Temps
1	95	15 min
40	95	30 s
	55	30 s
	72	30 s
1	95	1 min
1	55	30 s
1	95	30 s

6.11 Génotype des souches utilisées

ID	Alias	Provenance	Génotype
yFR116	W303	W303	MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3, GAL+, psi+
yFR118	S288C	S288C	MAT α , his3 ¹ , leu2 ⁰ , lys2 ⁰ , ura3 ⁰
yFR487	Rpb1-9myc	W303	MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3, GAL+, psi+, Rpb1-9myc TRP1
yFR033	<i>htz1</i> Δ	W303	MAT α , ura3-1, leu2-3,112, ade2-1, his3-11,15, trp1-1, can1-100, <i>htz1::hisG</i>
yFR212	<i>HTZ1</i> -3myc	W303	MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3-1, GAL+, psi+, <i>HtZ1::3myc</i>
yFR485	tet- <i>HTZ1</i> -3myc	W303	MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3-1, GAL+, psi+, TRP1-tetCYC1pr:: <i>HtZ1::3myc</i> , HTB1::3Flag KanMX

7. Références

- Adam,M., Robert,F., Larochelle,M., and Gaudreau,L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol. Cell Biol.* *21*, 6270-6279.
- Ahmad,K. and Henikoff,S. (2002b). Epigenetic consequences of nucleosome dynamics. *Cell* *111*, 281-284.
- Ahmad,K. and Henikoff,S. (2002a). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* *9*, 1191-1200.
- Ahn,S.H., Kim,M., and Buratowski,S. (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol. Cell* *13*, 67-76.
- Ausio,J., Abbott,D.W., Wang,X., and Moore,S.C. (2001). Histone variants and histone modifications: a structural perspective. *Biochem. Cell Biol.* *79*, 693-708.
- Barkai,N., Rose,M.D., and Wingreen,N.S. (1998). Protease helps yeast find mating partners. *Nature* *396*, 422-423.
- Becker,D.M. and Lundblad,V. (2001). Introduction of DNA into yeast cells. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* *Chapter 13*, Unit13.
- Becker,P.B. and Horz,W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 247-273.
- Boeger,H., Griesenbeck,J., Strattan,J.S., and Kornberg,R.D. (2004). Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding in vivo. *Mol. Cell* *14*, 667-673.
- Boeger,H., Griesenbeck,J., Strattan,J.S., and Kornberg,R.D. (2003). Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Mol. Cell* *11*, 1587-1598.
- Boehm,A.K., Saunders,A., Werner,J., and Lis,J.T. (2003). Transcription factor and polymerase recruitment, modification, and movement on dhsp70 in vivo in the minutes following heat shock. *Mol. Cell Biol.* *23*, 7628-7637.
- Bregman,D.B., Du,L., van der,Z.S., and Warren,S.L. (1995). Transcription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains. *J. Cell Biol.* *129*, 287-298.
- Brown,D.T. (2001). Histone variants: are they functionally heterogeneous? *Genome Biol.* *2*, REVIEWS0006.
- Carr,A.M., Dorrington,S.M., Hindley,J., Phear,G.A., Aves,S.J., and Nurse,P. (1994). Analysis of a histone H2A variant from fission yeast: evidence for a role in chromosome stability. *Mol. Gen. Genet.* *245*, 628-635.

- Chan,R.K. and Otte,C.A. (1982). Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones. *Mol. Cell Biol.* *2*, 21-29.
- Cheng,C. and Sharp,P.A. (2003). RNA polymerase II accumulation in the promoter-proximal region of the dihydrofolate reductase and gamma-actin genes. *Mol. Cell Biol.* *23*, 1961-1967.
- Cho,E.J., Kobor,M.S., Kim,M., Greenblatt,J., and Buratowski,S. (2001). Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev.* *15*, 3319-3329.
- Cho,E.J., Takagi,T., Moore,C.R., and Buratowski,S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* *11*, 3319-3326.
- Ciejek,E. and Thorner,J. (1979). Recovery of *S. cerevisiae* a cells from G1 arrest by alpha factor pheromone requires endopeptidase action. *Cell* *18*, 623-635.
- Clarkson,M.J., Wells,J.R., Gibson,F., Saint,R., and Tremethick,D.J. (1999). Regions of variant histone His2AvD required for *Drosophila* development. *Nature* *399*, 694-697.
- Corden,J.L. (1990). Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* *15*, 383-387.
- Core,L.J. and Lis,J.T. (2008). Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science* *319*, 1791-1792.
- Dai,Y., Ngo,D., Jacob,J., Forman,L.W., and Faller,D.V. (2008). Prohibitin and the SWI/SNF ATPase subunit BRG1 are required for effective androgen-antagonist-mediated transcriptional repression of androgen receptor-regulated genes. *Carcinogenesis*.
- David,L., Huber,W., Granovskaia,M., Toedling,J., Palm,C.J., Bofkin,L., Jones,T., Davis,R.W., and Steinmetz,L.M. (2006). A high-resolution map of transcription in the yeast genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 5320-5325.
- Davis,J.A., Takagi,Y., Kornberg,R.D., and Asturias,F.A. (2002). Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol. Cell* *10*, 409-415.
- Dhillon,N. and Kamakaka,R.T. (2000). A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. *Mol. Cell* *6*, 769-780.
- Dion,M.F., Kaplan,T., Kim,M., Buratowski,S., Friedman,N., and Rando,O.J. (2007). Dynamics of replication-independent histone turnover in budding yeast. *Science* *315*, 1405-1408.

- Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., and Bishop, J.M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell Biol.* *5*, 3610-3616.
- Faast, R., Thonglairoam, V., Schulz, T.C., Beall, J., Wells, J.R., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, P.D., Tremethick, D.J., and Lyons, I. (2001). Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr. Biol.* *11*, 1183-1187.
- Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Henry, N.L., and Kornberg, R.D. (1994). Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIF/TFIIK. *Cell* *79*, 1103-1109.
- Futcher, B. (1999). Cell cycle synchronization. *Methods Cell Sci.* *21*, 79-86.
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *13*, 837-848.
- Guillemette, B., Bataille, A.R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., and Gaudreau, L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol.* *3*, e384.
- Hampsey, M. and Reinberg, D. (2003). Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* *113*, 429-432.
- Haushalter, K.A. and Kadonaga, J.T. (2003). Chromatin assembly by DNA-translocating motors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 613-620.
- Henikoff, S. and Ahmad, K. (2005). Assembly of variant histones into chromatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 133-153.
- Hirose, Y. and Manley, J.L. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* *14*, 1415-1429.
- Hirose, Y. and Ohkuma, Y. (2007). Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *J. Biochem.* *141*, 601-608.
- Hong, E.L., Balakrishnan, R., Dong, Q., Christie, K.R., Park, J., Binkley, G., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Engel, S.R., Fisk, D.G., Hirschman, J.E., Hitz, B.C., Krieger, C.J., Livstone, M.S., Miyasato, S.R., Nash, R.S., Oughtred, R., Skrzypek, M.S., Weng, S., Wong, E.D., Zhu, K.K., Dolinski, K., Botstein, D., and Cherry, J.M. (2008). Gene Ontology annotations at SGD: new data sources and annotation methods. *Nucleic Acids Res.* *36*, D577-D581.
- Ishimi, Y., Hirosumi, J., Sato, W., Sugawara, K., Yokota, S., Hanaoka, F., and Yamada, M. (1984). Purification and initial characterization of a protein which facilitates assembly of nucleosome-like structure from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* *142*, 431-439.

- Jones, J.C., Phatnani, H.P., Haystead, T.A., MacDonald, J.A., Alam, S.M., and Greenleaf, A.L. (2004). C-terminal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats. *J. Biol. Chem.* *279*, 24957-24964.
- Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D., and Rine, J. (2004). A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS. Biol.* *2*, E131.
- Komarnitsky, P., Cho, E.J., and Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev.* *14*, 2452-2460.
- Kotovic, K.M., Lockshon, D., Boric, L., and Neugebauer, K.M. (2003). Cotranscriptional recruitment of the U1 snRNP to intron-containing genes in yeast. *Mol. Cell Biol.* *23*, 5768-5779.
- Kristjuhan, A. and Svejstrup, J.Q. (2004). Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin in vivo. *EMBO J.* *23*, 4243-4252.
- Krogan, N.J., Baetz, K., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Kwok, T.C., Thompson, N.J., Davey, M.G., Pootoolal, J., Hughes, T.R., Emili, A., Buratowski, S., Hieter, P., and Greenblatt, J.F. (2004). Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 13513-13518.
- Krogan, N.J., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, D.P., Beattie, B.K., Emili, A., Boone, C., Shilatifard, A., Buratowski, S., and Greenblatt, J. (2003). Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.* *23*, 4207-4218.
- Larochelle, M. and Gaudreau, L. (2003). H2A.Z has a function reminiscent of an activator required for preferential binding to intergenic DNA. *EMBO J.* *22*, 4512-4522.
- Lee, C.K., Shibata, Y., Rao, B., Strahl, B.D., and Lieb, J.D. (2004). Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat. Genet.* *36*, 900-905.
- Lee, D. and Lis, J.T. (1998). Transcriptional activation independent of TFIIF kinase and the RNA polymerase II mediator in vivo. *Nature* *393*, 389-392.
- Lee, W., Tillo, D., Bray, N., Morse, R.H., Davis, R.W., Hughes, T.R., and Nislow, C. (2007). A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nat. Genet.* *39*, 1235-1244.
- Liu, P., Greenleaf, A.L., and Stiller, J.W. (2008). The essential sequence elements required for RNAP II carboxyl-terminal domain function in yeast and their evolutionary conservation. *Mol. Biol. Evol.* *25*, 719-727.

- Liu, X., Li, B., and Gorovsky, M. A. (1996). Essential and nonessential histone H2A variants in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell Biol.* *16*, 4305-4311.
- Liu, Y., Kung, C., Fishburn, J., Ansari, A. Z., Shokat, K. M., and Hahn, S. (2004). Two cyclin-dependent kinases promote RNA polymerase II transcription and formation of the scaffold complex. *Mol. Cell Biol.* *24*, 1721-1735.
- Livak, K., Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* *25*, 402-408.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251-260.
- Mangan, M. E., Williams, J. M., Lathe, S. M., Karolchik, D., and Lathe, W. C., III (2008). UCSC Genome Browser: Deep support for molecular biomedical research. *Biotechnol. Annu. Rev.* *14*, 63-108.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S., and Bentley, D. L. (1997). 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev.* *11*, 3306-3318.
- Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S., and Cramer, P. (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes Dev.* *19*, 1401-1415.
- Meneghini, M. D., Wu, M., and Madhani, H. D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* *112*, 725-736.
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W. H., Sen, S., and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* *303*, 343-348.
- Morillon, A., O'Sullivan, J., Azad, A., Proudfoot, N., and Mellor, J. (2003). Regulation of elongating RNA polymerase II by forkhead transcription factors in yeast. *Science* *300*, 492-495.
- Morris, D. P., Michelotti, G. A., and Schwinn, D. A. (2005). Evidence that phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeats is similar in yeast and humans. *J. Biol. Chem.* *280*, 31368-31377.
- Mujumdar, R. B., Ernst, L. A., Mujumdar, S. R., Lewis, C. J., and Waggoner, A. S. (1993). Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug. Chem.* *4*, 105-111.
- Ng, H. H., Robert, F., Young, R. A., and Struhl, K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol. Cell* *11*, 709-719.

- 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.
- Palancade, B. and Bensaude, O. (2003). Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 270, 3859-3870.
- Park, Y.J., Dyer, P.N., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2004). A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J. Biol. Chem.* 279, 24274-24282.
- Phatnani, H.P. and Greenleaf, A.L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev.* 20, 2922-2936.
- Proudfoot, N.J., Furger, A., and Dye, M.J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108, 501-512.
- Quivy, J.P., Roche, D., Kirschner, D., Tagami, H., Nakatani, Y., and Almouzni, G. (2004). A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. *EMBO J.* 23, 3516-3526.
- Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J., and Madhani, H.D. (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 123, 233-248.
- Rangasamy, D., Greaves, I., and Tremethick, D.J. (2004). RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 650-655.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 162-169.
- Reinke, H. and Horz, W. (2003). Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol. Cell* 11, 1599-1607.
- Ridgway, P., Brown, K.D., Rangasamy, D., Svensson, U., and Tremethick, D.J. (2004). Unique residues on the H2A.Z containing nucleosome surface are important for *Xenopus laevis* development. *J. Biol. Chem.* 279, 43815-43820.
- Roeder, R.G. (1991). The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem. Sci.* 16, 402-408.
- Rufiange, A., Jacques, P.E., Bhat, W., Robert, F., and Nourani, A. (2007). Genome-wide replication-independent histone H3 exchange occurs predominantly at promoters and implicates H3 K56 acetylation and Asf1. *Mol. Cell* 27, 393-405.
- Saiz, L. and Vilar, J.M. (2006). DNA looping: the consequences and its control. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 344-350.

- Santisteban, M.S., Kalashnikova, T., and Smith, M.M. (2000). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* 103, 411-422.
- Schroeder, S.C., Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D. (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev.* 14, 2435-2440.
- Schwabish, M.A. and Struhl, K. (2004). Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.* 24, 10111-10117.
- Serizawa, H., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (1993). Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription. *Nature* 363, 371-374.
- Shelby, R.D., Vafa, O., and Sullivan, K.F. (1997). Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites. *J. Cell Biol.* 136, 501-513.
- Shia, W.J., Pattenden, S.G., and Workman, J.L. (2006). Histone H4 lysine 16 acetylation breaks the genome's silence. *Genome Biol.* 7, 217.
- Singh, B.N., Hampsey, M. (2007). A transcription-independent role for TFIIB in gene looping. *Mol Cell.* 27, 806.
- Smith, M.M. (2002). Histone variants and nucleosome deposition pathways. *Mol. Cell* 9, 1158-1160.
- Smith, S. and Stillman, B. (1989). Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell* 58, 15-25.
- Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., and Futcher, B. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell* 9, 3273-3297.
- Steinmetz, E.J., Warren, C.L., Kuehner, J.N., Panbehi, B., Ansari, A.Z., and Brow, D.A. (2006). Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase. *Mol. Cell* 24, 735-746.
- Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1121-1124.
- Swaminathan, J., Baxter, E.M., and Corces, V.G. (2005). The role of histone H2Av variant replacement and histone H4 acetylation in the establishment of *Drosophila* heterochromatin. *Genes Dev.* 19, 65-76.

Thompson,N.E., Steinberg,T.H., Aronson,D.B., and Burgess,R.R. (1989). Inhibition of in vivo and in vitro transcription by monoclonal antibodies prepared against wheat germ RNA polymerase II that react with the heptapeptide repeat of eukaryotic RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* *264*, 11511-11520.

Tyler,J.K., Adams,C.R., Chen,S.R., Kobayashi,R., Kamakaka,R.T., and Kadonaga,J.T. (1999). The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* *402*, 555-560.

Verreault,A. (2000). De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* *14*, 1430-1438.

Wuarin,J. and Schibler,U. (1994). Physical isolation of nascent RNA chains transcribed by RNA polymerase II: evidence for cotranscriptional splicing. *Mol. Cell Biol.* *14*, 7219-7225.

Xiao,T., Hall,H., Kizer,K.O., Shibata,Y., Hall,M.C., Borchers,C.H., and Strahl,B.D. (2003). Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast. *Genes Dev.* *17*, 654-663.

Yuan,G.C., Liu,Y.J., Dion,M.F., Slack,M.D., Wu,L.F., Altschuler,S.J., and Rando,O.J. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* *309*, 626-630.

Zhang,H., Roberts,D.N., and Cairns,B.R. (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* *123*, 219-231.

