



Rôle de CK2 dans la dynamique de la chromatine et la précision transcriptionnelle

Thèse

Emmanuelle GOUOT

Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Emmanuelle GOUOT, 2017

Rôle de CK2 dans la dynamique de la chromatine et la précision transcriptionnelle

Thèse

Emmanuelle GOUOT

Sous la direction de :

Amine NOURANI, directeur de recherche

Résumé

La transcription par l'ARN polymérase II (ARNP II) est un mécanisme promiscuitaire à l'origine d'évènements transcriptionnels hasardeux, qui génèrent continuellement des transcrits aberrants dans la cellule. L'organisation précise du matériel génétique sous forme de chromatine est cruciale pour améliorer la précision de l'ARNP II en orientant sa fonction pour limiter ses erreurs et empêcher cette transcription cryptique. La structure chromatinienne est très dynamique et plusieurs mécanismes moléculaires coopèrent afin de déstabiliser les nucléosomes en amont de l'ARNP II, pour autoriser la lecture de l'ADN, et de les reconstituer dans son sillage, pour maintenir l'organisation chromatinienne du génome. De façon intéressante, une fonction potentielle de la caséine kinase 2 (CK2) dans la dynamique de la chromatine est suggérée dans la littérature. CK2 est une protéine kinase essentielle, conservée chez les eucaryotes, et impliquée dans des processus cellulaires variés. Dans notre étude, nous explorons le rôle de CK2 dans les modulations de la chromatine associées à la transcription. Nous avons démontré que CK2 phosphoryle le chaperon d'histones Spt6, régulant ainsi sa stabilité et sa fonction d'organisateur chromatinien. L'inactivation de cette voie de régulation conduit à l'accumulation considérable de transcrits cryptiques provenant d'initiations opportunistes intragéniques sens et antisens. La phosphorylation de Spt6 par CK2 favorise le recyclage des histones H3/H4 en 3' des régions codantes et participe ainsi à la conservation de la structure de la chromatine lors de la transcription et à la suppression de la transcription cryptique. Notre étude suggère en outre que les fonctions de CK2 dans la modulation de la chromatine et la précision transcriptionnelle pourraient s'étendre au-delà de la régulation de Spt6, via la modulation de facteurs tels que les complexes PAF ou FACT. Enfin, nous proposons que la suppression de la transcription cryptique par CK2 contribue à optimiser la transcription afin d'améliorer la réponse transcriptionnelle à des stress extérieurs. L'ensemble de notre étude montre que CK2 stimule la précision transcriptionnelle en régulant directement Spt6 et probablement d'autres facteurs impliqués dans le maintien co-transcriptionnel de la chromatine. Ce mécanisme est crucial pour préserver le programme d'expression du génome et favorise la plasticité et l'efficacité de la réponse transcriptionnelle aux signaux de stress, nécessaires à l'adaptation de la cellule à son environnement.

Abstract

Transcription by RNA polymerase II (RNAPII) is pervasive and aberrant transcripts are permanently generated within cells. Precise and controlled genomic organization in chromatin structure is essential to improve RNAPII accuracy and prevent cryptic transcripts accumulation. Chromatin structure is highly dynamic during transcription, unfolded to give access to DNA and refolded back in the wake of RNAPII to prevent spurious transcription. Multiple mechanisms act together to make this process highly efficient. Casein Kinase 2 (CK2) is a protein kinase ubiquitously present among eukaryotes and implicated in various important cellular processes. Interestingly, a potential function of this kinase in chromatin dynamics through the regulation of chromatin factors has previously been suggested. In this study, we address the role of CK2 in chromatin modulations associated with transcription. We found that CK2 depletion from yeast cells results in an increase of histone turnover in 3' of transcribed regions and spurious transcription from cryptic promoters. Interestingly, we demonstrate that CK2 modulates directly Spt6 histone chaperone stability and function. This regulation promotes histone recycling during transcription elongation and maintain chromatin organization within coding regions, thereby inhibiting cryptic intragenic and antisense transcription. Our study also suggests that CK2 suppression of spurious transcription extend beyond Spt6 regulation. Indeed, we describe that additional role of CK2 with respect to spurious transcription could be related to its regulation of RNAP II activity through CTD Ser2 phosphorylation. Chromatin regulators such as PAF complex and FACT could also be involved in this regulation process. Finally, we propose that CK2 suppression of spurious transcription is essential for transcriptional optimal and efficient responses to environmental signals. Altogether, our data highlights CK2 signaling pathway as a regulator of transcription accuracy by affecting the essential histone chaperone Spt6, and probably other factors directly involved in the transcriptional process. This mechanism is important to the suppression of cryptic transcription in steady state conditions but also seems to contribute to the fitness of an optimal cellular response to stress signals.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements	xv
Avant-propos	xvii

Chapitre I : Introduction..... 1

1.1. La transcription par l'ARN polymérase II : complexité de l'expression des génomes eucaryotes.....	2
1.1.1. L'ARN polymérase II et son domaine carboxy-terminal ou CTD.....	3
1.1.2. Cycle transcriptionnel canonique d'un ARNm	5
1.1.3. La transcription non-codante.....	6
1.2. La chromatine : organisation spatiale et fonctionnelle du génome	9
1.2.1. La compaction de l'ADN	10
1.2.2. Le nucléosome.....	11
1.2.3. Positionnement des nucléosomes dans les régions codantes.....	13
1.2.4. Dynamique des nucléosomes : l'échange d'histones	15
1.2.5. Chromatine et épigénétique.....	17
1.3. Différents mécanismes régulent la structure de la chromatine.....	17
1.3.1. Les modifications post-traductionnelles des histones	18
1.3.2. Les variants d'histones	20
1.3.3. Les complexes de remodelage chromatiniens ATP dépendants.....	21
1.3.3.1. Rôle biologique et mode d'action	21
1.3.3.2. Les classes de complexes de remodelage	23
1.3.4. Les chaperons d'histones	27
1.4. Mécanismes régulateurs de la chromatine au cours de la transcription	29
1.4.1. La transcription dans le contexte de la chromatine	29
1.4.2. Modifications post-traductionnelles des histones lors de l'élongation transcriptionnelle.....	34
1.4.2.1. Acétylation	34
1.4.2.2. Méthylation	36
1.4.2.3. Ubiquitination.....	37
1.4.3. Complexes de remodelage ATP-dépendants et élongation transcriptionnelle	38
1.4.4. Chaperons d'histones impliqués dans l'élongation transcriptionnelle	40
1.4.4.1. Le complexe Spt6-Iws1	40
1.4.4.2. Le complexe FACT.....	47
1.4.4.3. Le facteur Spt2	48
1.5. La Caséine Kinase 2.....	50

1.5.1.	Propriétés.....	50
1.5.2.	Implications de CK2 dans la régulation de la chromatine.....	51
1.6.	Hypothèse et objectifs du projet de doctorat	54

Chapitre II : Casein Kinase 2 Mediated Phosphorylation of Spt6 Modulates Histone dynamics and Regulates Spurious Transcription..... 58

2.1.	Résumé.....	59
2.2.	Abstract	61
2.3.	Introduction	62
2.4.	Material and methods	65
2.4.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains and plasmids.....	65
2.4.2.	Western blot and antibodies.	66
2.4.3.	Protein purification and <i>in vitro</i> phosphorylation assay.....	66
2.4.4.	Immunoprecipitation experiments.....	66
2.4.5.	Protein Stability Assay	67
2.4.6.	Stress induction assays	67
2.4.7.	Chromatin Immunopurification (ChIP).....	68
2.4.8.	RNA analyses	68
2.4.9.	RNAseq data processing	69
2.4.10.	ChIP Seq analyses	69
2.5.	Results.....	72
2.5.1.	CK2 regulates replication-independent H3K56 acetylation in transcribed regions ..	72
2.5.2.	CK2 prevents global histone exchange in 3'end of genes independently of H3K36me3	72
2.5.3.	CK2 inhibits antisense transcription.....	73
2.5.4.	CK2 represses spurious transcription from intragenic cryptic promoters	74
2.5.5.	CK2 interacts with and phosphorylates the transcription elongation associated histone chaperone Spt6.....	75
2.5.6.	Phosphorylation by CK2 regulates Spt6 function	77
2.5.7.	Spt6 phosphorylation sites play an essential role in the repression of antisense and cryptic transcription.....	78
2.5.8.	CK2 phosphorylation sites in Spt6 are required for the global repression of transcription from intragenic cryptic promoters.....	79
2.5.9.	Spt6 phosphorylation mutants regulate cryptic sense and antisense transcription at promoters that are also affected by CK2	80
2.5.10.	CK2 phosphorylation sites are required for the stability of Spt6	81
2.5.11.	Restoring Spt6 cellular level in CK2 depleted cells suppresses new histone H3 incorporation and spurious transcription from <i>FLO8</i> cryptic promoter.....	82
2.5.12.	Phosphorylation of Spt6 by CK2 is important for the efficient transcriptional response to environmental signals and stresses.....	83
2.6.	Discussion	84
2.6.1.	CK2 controls the nature of nucleosomes in the 3'end of transcribed regions.....	85
2.6.2.	CK2 mediated phosphorylation of Spt6 modulate chromatin in transcribed regions	86

2.6.3.	CK2 may help RNAP II to focus on real promoters to allow optimal cell response to environmental challenges	87
2.7.	Figures.....	90
2.8.	Supplementary figures.....	103
2.9.	References	107

Chapitre III : CK2 est au centre d’une orchestration complexe de plusieurs voix de régulation de la chromatine pendant l’élargissement de la transcription..... 113

3.1.	Résumé.....	114
3.2.	Abstract	115
3.3.	Introduction	116
3.4.	Matériel et méthodes	119
3.4.1.	Souches de levures, plasmides et milieux	119
3.4.2.	Purification des protéines	120
3.4.3.	Essai de phosphorylation <i>in vitro</i>	120
3.4.4.	Pulldown et co-immunoprécipitation	121
3.4.5.	Immunobuvardage.....	122
3.4.6.	Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....	122
3.4.7.	Analyse de ChIP Seq.....	123
3.5.	Résultats	126
3.5.1.	CK2 phosphoryle le partenaire essentiel de Spt6 : Iws1.	126
3.5.2.	L’interaction Spt6-Iws1 <i>in vitro</i> est uniquement stimulée par la phosphorylation de Spt6	130
3.5.3.	L’interaction Spt6-Iws1 <i>in vivo</i> ne dépend pas de CK2	132
3.5.4.	Fonctionnellement, seule la phosphorylation de Spt6 semble importante dans le maintien de la chromatine au cours de la transcription	133
3.5.5.	CK2 influence indirectement le recrutement de Spt6-Iws1 aux régions transcrites.136	
3.5.6.	CK2 n’est pas requis dans le processus de triméthylation d’H3K36 sur les régions codantes	140
3.5.7.	CK2 maintient l’organisation de la chromatine au cours de la transcription par des mécanismes alternatifs à la régulation de Spt6.	142
3.5.8.	CK2 module de façon globale le recrutement aux gènes de l’ARNPII.....	144
3.5.9.	CK2 module la phosphorylation du CTD sur les sérines 2	146
3.5.10.	La modulation de pSer2 dans les mutants <i>ck2^{ts}</i> est indépendante de Spt6.	147
3.6.	Discussion	152
3.6.1.	La phosphorylation de Iws1 par CK2 ne semble pas intervenir dans la maintenance de la structure de la chromatine au cours de l’élargissement transcriptionnelle.	153
3.6.2.	CK2 influence l’interaction Spt6-Iws1 <i>in vitro</i> via la phosphorylation de Spt6.	155
3.6.3.	La déplétion de CK2 affecte indirectement l’occupation de Spt6-Iws1 aux régions transcrites via une élévation globale du niveau d’ARNPII.	156
3.6.4.	CK2 ne régule pas le processus de triméthylation d’H3K36 pour supprimer la transcription cryptique.....	157
3.6.5.	La maintenance chromatiniennne dépendante de CK2 est multifactorielle.	157

3.7. Figures supplémentaires.....	160
Chapitre IV : Discussion et conclusion.....	162
4.1. CK2 module la fonction de Spt6 pour favoriser la conservation co-transcriptionnelle des histones.....	164
4.2. CK2 joue un rôle général dans la préservation de la fidélité transcriptionnelle.....	166
4.3. CK2 régule-t-elle les interactions de Spt6 avec ses différents partenaires ?.....	169
4.4. CK2 régule le niveau cellulaire de Spt6 pour moduler sa fonction.....	171
4.5. L'absence de CK2 altère la distribution et l'activité de l'ARNPII	173
4.6. Conséquences cellulaires de l'élévation de la transcription cryptique	175
4.7. Conclusion.....	177
Bibliographie	180
Annexe	205

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Variants des histones H3 et H2A et fonctions biologiques	21
Tableau 1.2 : Les principaux chaperons d'histones et leurs implications fonctionnelles.....	28
Tableau 1.3 : Gènes codants pour les protéines de la famille SPT et leur fonction	41
Tableau 2.1 : Yeast strains	70
Tableau 2.2 : Sequence of oligonucleotides used in the study	71
Tableau 3.1 : Souches de levures	124

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 : Profil de phosphorylation des sérines 2 et 5 du CTD de l'ARNPII.....	4
Figure 1.2 : La chromatine garantit l'homéostasie transcriptionnelle.....	9
Figure 1.3 : Organisation de la chromatine	10
Figure 1.4 : Structure d'un nucléosome	12
Figure 1.5 : Profil d'occupation des nucléosomes sur un gène	14
Figure 1.6 : Les principales modifications post-traductionnelles des histones	19
Figure 1.7 : Actions des complexes de remodelage chromatinien	22
Figure 1.8 : Les sous-unités catalytiques des complexes de remodelage.....	23
Figure 1.9 : Initiation de la transcription au sein de la chromatine	31
Figure 1.10 : Élongation transcriptionnelle au travers des nucléosomes	33
Figure 1.11 : Distribution des marques d'histones sur les régions codantes.....	34
Figure 1.12 : Représentation des 3 domaines structuraux de Spt6 et des fonctions associées.....	43
Figure 1.13 : Implication du complexe Spt6-Iws1 dans les mécanismes co-transcriptionnels	46
Figure 1.14 : Modèle de travail sur l'implication de CK2 dans la régulation fonctionnelle à la chromatine des chapérons d'histones au cours de l'élongation.....	53

Chapitre 2

Figure 2.1 : Histone H3 turnover is increased in <i>ck2^{ts}</i> mutant at coding regions.....	90
Figure 2.2 : CK2 regulates transcriptional accuracy	92
Figure 2.3 : CK2 Interacts with Spt6 and phosphorylates it <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	94
Figure 2.4 : Phosphorylation by CK2 regulates Spt6 chromatin function	95
Figure 2.5 : Spt6 phosphorylation regulates cryptic intragenic and antisense transcription	97
Figure 2.6 : CK2-dependent phosphorylation is critical for Spt6 stability and chromatin functions..	99
Figure 2.7 : CK2-Spt6 regulation pathway is required for transcriptional response dynamics to external stress signals	101
Figure 2.8 : Mechanism of chromatin regulation by CK2	102
Figure 2.S1 : CK2 regulates histone H3 turnover	102
Figure 2.S2 : Reproducibility of antisense ratio from RNA-seq analyses in WT and <i>ck2^{ts}</i> mutant	102
Figure 2.S3 : Reproducibility of 3'/5' ratio from RNA-seq analyses in WT and <i>ck2^{ts}</i> mutant	104
Figure 2.S4 : Mass spectrometry analyse of <i>in vivo</i> purified Spt6.....	105
Figure 2.S5 : Reproducibility of 3'/5' ratio from RNA-seq analyses in WT and <i>spt6 7S-A</i> mutant	106
Figure 2.S6 : Protein level is critical for Spt6 chromatin functions and regulated by CK2-dependent phosphorylation	106

Chapitre 3

Figure 3.1 : Iws1 est cible de CK2	127
Figure 3.2 : Identification des sites des phosphorylation par CK2 dans la région N terminale d'Iws1	129
Figure 3.3 : La phosphorylation de Iws1 par CK2 ne stimule pas la formation du complexe Spt6-Iws1 <i>in vitro</i>	131
Figure 3.4 : CK2 ne semble pas affecter l'interaction Spt6-Iws1 <i>in vivo</i>	133
Figure 3.5 : La régulation par CK2 de Spt6-Iws1 est indépendante de la phosphorylation d'Iws1	135
Figure 3.6 : L'état de phosphorylation de Spt6 dépendant de CK2 n'influence ni son recrutement, ni le recrutement d'Iws1 aux gènes constitutivement actifs.....	137
Figure 3.7 : Le recrutement d'Iws1 à la chromatine n'est pas affecté dans les mutants <i>ck2^{ts}</i> au regard du recrutement de l'ARNPII	139
Figure 3.8 : Le dépôt d'H3K36me3 par Set2 dans les régions codantes est indépendant de CK2 .	141
Figure 3.9 : CK2 réprime la transcription cryptique via d'autres voies que la régulation de Spt6 .	143
Figure 3.10 : Le niveau d'ARNPII augmente aux régions codantes en absence de CK2	145
Figure 3.11 : CK2 est impliquée dans la modulation de la phosphorylation de la sérine 2 du CTD	147
Figure 3.12 : La modulation de pSer2 par CK2 est indépendante de la phosphorylation de Spt6..	149
Figure 3.13 : Interaction génétique et fonctionnelle entre CK2 et le complexe PAF.....	152
Figure 3.14 : Comparaison d'une partie de la séquence peptidique d'Iws1 et Spt5 de levure.....	154
Figure 3.S1 : Le recrutement d'Iws1 à <i>PMA1</i> dépend de Spt6 mais pas l'inverse	160
Figure 3.S2 : Niveau d'occupation d'ARNPII pour 10 groupes de gènes	160
Figure 3.S3 : Évaluation du niveau d'ARNPII phosphorylée sur les sérines 5 et 2 du CTD	161
Figure 3.S4 : Les facteurs d'élongation Chd1-Flag, Spt16-Flag et Spt5-Flag interagissent avec les sous-unités catalytiques de CK2	161

Chapitre 4

Figure 4.1 : CK2 phosphoryle Spt6 pour favoriser le recyclage au détriment de l'échange d'histones lors de l'élongation transcriptionnelle.....	165
Figure 4.2 : Modèle de travail selon lequel CK2 favorise l'échange entre les facteurs Spt2 et Iws1 successivement en complexe avec Spt6 pour réguler sa fonction.....	170
Figure 4.3 : CK2 favorise l'efficacité de la réponse transcriptionnelle aux signaux extérieurs en optimisant la réponse transcriptionnelle via une bonne organisation de la structure de la chromatine	179

Liste des abréviations

ACT1	<i>Actin 1</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messenger
ARNPII	ARN Polymérase II
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ASF1	<i>Anti-silencing function 1</i>
ATP	Adénosine triphosphate
Bp	<i>base pair</i>
CenH3	<i>Centromeric H3</i>
CHD	<i>Chromodomain Helicase DNA binding</i>
ChIP	<i>Chromatin ImmunoPrecipitation</i>
CK2	Caséine Kinase 2
CLN3	<i>CycLiN 3</i>
COMPASS	<i>COMplex Proteins Associated with Set1</i>
CTD	<i>C Terminal Domain</i>
Ctk1	<i>C terminal domain kinase 1</i>
CUT	<i>Cryptic Unstable Transcripts</i>
DBP	<i>DNA Binding Protein</i>
DLD	<i>Death-Like Domain</i>
DSIF	<i>DRB-sensitivity-inducing Factor</i>
ENCODE	<i>Encyclopedia of DNA Elements</i>
eRNA	<i>enhancer RNA</i>
FACT	<i>FAcilitates Chromatin Transcription</i>
FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HAT	<i>Histone AcetylTransferase</i>
HDAC	<i>Histone DeACetylase</i>
HhH	<i>Helix-Hairpin-Helix</i>
HMG	<i>High-Mobility Group</i>
HtH	<i>Helix-Turn-Helix</i>
INO	<i>Inositol requiring</i>

ISWI	<i>Imitation Switch</i>
IWS1	<i>Interact With Spt6</i>
MNase	<i>Micrococcal Nuclease</i>
NAP1	<i>Nucleosome Assembly Protein 1</i>
NELF	<i>Negative Elongation Factor</i>
NFR	<i>Nucleosome Free Region</i>
NuA4	<i>Nucleosome Acetyltransferase of H4</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAF	<i>Polymerase Associated Factor</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PHD	<i>Plant Homeodomain</i>
PIC	<i>PreInitiation Complex</i>
PMA1	<i>Plasma Membrane ATPase 1</i>
PROMPT	<i>Promoter upstream transcripts</i>
PTEF-b	<i>Positive Transcription Elongation Factor-b</i>
PTM	<i>Post Traductional Modification</i>
Rpd3	<i>Reduced potassium dependency 3</i>
RSC	<i>Remodel the Structure of Chromatin</i>
SAGA	<i>Spt-Ada-Gcn5 Acétyltransférase</i>
SANT	<i>Swi3, Ada2, N-Cor TFIIB</i>
SH2	<i>Src Homology 2</i>
siARN	<i>Small Interference ARN</i>
Sin1	<i>Swi Independant 1</i>
SLIDE	<i>SANT-like ISWI domain</i>
snoARN	<i>Small Nucleolar ARN</i>
Spn1	<i>Suppresses Postrecruitment Number 1</i>
SPT	<i>SuPpressor of Ty</i>
SUT	<i>Stable Unannoted Transcripts</i>
SWI/SNF	<i>Mating type switching/Sucrose nonfermenting</i>
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i>
TBP	<i>TATA Binding Protein</i>
TF (II A, B, D, E, F, H)	<i>Transcription Factor</i>
ts	<i>ThermoSensible</i>
UBP8	<i>Ubiquitin Specific Protease 8</i>
UTR	<i>UnTranslated Region</i>
WT	<i>Wild Type</i>
XUT	<i>Xrn1-sensitive Unstable Transcripts</i>

À ma grand-mère, Marguerite Rose
À ma mère, Hélène

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Amine Nourani, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant dans son laboratoire. Merci de m'avoir donné la chance de faire ma place dans le milieu de la recherche, en me laissant mener mon travail avec une grande liberté. Ces années dans votre laboratoire m'ont enseigné l'autonomie et à ne pas avoir peur de prendre des initiatives. Vous m'avez aussi appris à développer mon esprit critique et à porter une attention particulière au choix des mots justes. Aussi, vous m'avez donné l'opportunité de présenter mon travail dans plusieurs congrès, au Canada et ailleurs. Je ressors grandie de ces expériences, tant sur le plan scientifique que personnel. A l'heure du bilan, je réalise que certains projets n'ont malheureusement pas abouti, mais vous m'avez toujours aidé à retomber sur mes pieds, et j'espère modestement en retour que mon travail contribuera à l'avancée de votre laboratoire et sera pérennisé par des projets futurs.

Je remercie également l'ensemble des membres présents ou passés du laboratoire. Merci Anne pour ton soutien, ton écoute attentive tout au long de ces années et pour ta maîtrise absolue de la PCR sur colonie! Plus qu'une collègue, tu es devenue une amie très chère. Je suis impatiente à l'idée de te faire visiter mon petit bout de France. Merci à mes collègues et amies Geneviève et Marine, qui m'ont accueillie à Québec et initiée au bench à mon arrivée dans le laboratoire. Vous m'avez beaucoup manqué ces 2 dernières années, mais nous garderons le lien et je sais que nos routes se croiseront encore. Merci à Wajid, qui a plus qu'amplement initié le projet, et enfin à Lynda, pour ses petites attentions et sa bienveillance constante.

Un grand merci à tous les collègues du centre de recherche pour leur aide et leur contribution importante à la réalisation de mon travail doctoral, en particulier :

Un très grand merci aux bio-informaticiens Eric Fournier et Eric Paquet, pour leurs analyses et leur travail absolument indispensable à l'avancée de tous nos projets au laboratoire.

Merci au Dr Nicolas Bisson, pour son aide et son expertise en spectrométrie de masse au début de mon doctorat.

Merci au laboratoire du Dr Jacques Côté, tant pour le prêt régulier de matériel que pour les conversations enrichissantes et stimulantes, qui m'ont été fortement utiles dans mon projet. Dorine, Mathieu, Karine, Valérie, Anna, Salar, Jonathan et ma p'tite Maeva...vous côtoyer et partir en meeting en votre compagnie a été un vrai plaisir!

Enfin, ma gratitude va à toute l'équipe du Dr Josée Lavoie. Vous m'avez tous accompagnée et épaulée quotidiennement et je suis chanceuse d'avoir partagé avec vous le 3eme étage du St Patrick. Merci de m'avoir permis de profiter de vos outils de travail, j'ai nommé le Gel Doc et la cafetière! Votre laboratoire a été pour moi une source inépuisable de conseils toujours avisés et de discussions scientifiques et techniques productives. Vous avez pris le temps de porter un regard extérieur sur mes recherches qui a été essentiel à la progression de ma réflexion.

Ma reconnaissance va aussi à ceux qui ont assuré les moments de réconfort et d'évasion :

Les pauses café, les tentatives de remise en forme au nautilus, les fins de semaine en vadrouille, les pique-niques sur les plaines, les sessions footing, les repas pantagruéliques, les apéros accidentels ou prémédités, Dave Grohl sous l'orage, les pieds qui gèlent au carnaval, les rencontres au Jules et Jim, les dimanches TP-salsa-démesure... Pour toutes nos aventures, un grand merci plein d'émotion à mes amis rencontrés à Québec : Alex, Claire, Aksam, Carole, Imène, JC, Laurianne, Alice B, Laurent, Alice V, Khalid, Solenn, Rémy, Gaëlle, Mel, Françoise, Maeva, Cornelia, Myriam, Seb, Clémence... L'énergie de notre belle bande de potes a coloré ma vie « icitte », au lab et en dehors. C'était bien.

Merci aussi à tous mes Gersois, mes amis de France, pour m'avoir gardé une belle place au soleil malgré la distance, et avoir toujours répondu présent quand j'en ai eu besoin. Vos cartes postales ont alimenté mes envies de tour du monde (en véhicule motorisé...) pendant ces années. Merci pour vos visites, vos mails, nos Skype à effet vitaminé immédiat! Une pensée spéciale à Béné, ma précieuse partenaire de fuseau horaire...

Je remercie également ma famille pour leurs encouragements constants et leur colis remplis de douceurs. Lucile et JM, Marie-Paule, André et mon frère, Jean-Loup, merci d'être passés me voir, en été comme en hiver, pour apporter dans vos valises un petit bout de maison, et me laisser d'inoubliables souvenirs du Québec à vos côtés.

Merci à ma mère, qui m'entoure, m'aide invariablement et me supporte dans mes choix. Tes visites m'ont été très chères ... l'admiration que je te porte et nos conversations quotidiennes, les indispensables sources de ma détermination. Tu m'as offert la chance de poursuivre mon parcours universitaire dans le plus grand confort moral et matériel, et c'est avec beaucoup de reconnaissance que j'ai écrit ce manuscrit qui t'es dû.

Je remercie enfin Mathieu, pour avoir braver la neige et le blizzard de l'hiver Québécois au péril de sa vie (verbatim) et m'avoir accompagnée et soutenue au quotidien tout au long de cette entreprise loin de chez nous. Ton calme et ta patience, aujourd'hui légendaires, ainsi que tes plats réconfortants sont un remède à toutes mes craintes.

Je souhaite pour terminer remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Avant-propos

Les travaux présentés ici sont le résultat de mon travail de thèse au sein du laboratoire du Dr Amine Nourani. Au cours de mon doctorat, j'ai participé à la réalisation d'un manuscrit en tant que première auteure.

Mon projet principal fait l'objet du chapitre 2. Il a consisté à caractériser le rôle de CK2 dans la dynamique des nucléosomes au cours de la transcription et a permis de mettre en évidence la régulation CK2-dépendante du chaperon d'histones Spt6 et l'importance de cette voie de régulation dans l'organisation chromatinienne des régions codantes, la suppression de la transcription cryptique et l'efficacité transcriptionnelle de la réponse aux stress extérieurs. Ce projet a donné naissance à un article qui sera très prochainement soumis à la publication et intitulé : *Casein Kinase 2 Mediated Phosphorylation of Spt6 Modulates Histone dynamics and Regulates Spurious Transcription*

Les co-auteurs de cet article sont Wajid Bhat, Anne Rufiange, Eric Fournier, Eric Paquet et Amine Nourani.

Dans le chapitre 3, j'ai poursuivi la caractérisation de la régulation chromatinienne et transcriptionnelle de CK2 qui s'étend probablement à d'autres facteurs organisateurs de la chromatine, au-delà de la régulation de Spt6.

L'ensemble de ces travaux n'aurait pu voir le jour sans l'aide des co-auteurs cités.

Ce travail a été supporté par une subvention des IRSC ainsi qu'une Chaire de recherche du Canada détenue par le Dr Amine Nourani.

Chapitre I: Introduction

1.1. La transcription par l'ARN polymérase II : complexité de l'expression des génomes eucaryotes.

L'ADN est le support stable et transmissible de l'information génétique. Depuis la fin des années 1950, il est admis que les gènes codent pour les protéines, et que c'est la séquence d'ADN qui gouverne la séquence peptidique : un code génétique universel, commun à tous les êtres vivants est proposé. En 1961, Jacob, Monod et Lwoff montrent que les gènes sont d'abord transcrits en une molécule intermédiaire baptisée « messenger ». Il s'agit d'un ARNm (acide ribonucléique messenger), qui est à son tour traduit en protéine. Ils démontrent que la transcription de l'ADN en ARNm dépend de protéines régulatrices qui se fixent au niveau des séquences promotrices du gène de la β -Galactosidase et mettent ainsi en évidence le premier mode de régulation transcriptionnel (Jacob and Monod, 1961). L'ensemble de ces travaux effectués chez *Escherichia coli* sera récompensé en 1965 par le prix Nobel de médecine. L'ARNm est à cette époque le lien manquant qui relie un gène à la protéine pour laquelle il code. La relation Gène-ARN-Protéine énoncée par Francis Crick en 1958 devient alors la théorie fondamentale de la biologie moléculaire. L'enzyme responsable de la transcription des gènes est l'ARN polymérase II (ARNPII), elle est l'acteur principal de la première étape de l'expression du génome. La vision conventionnelle de la transcription par l'ARNPII a longtemps été que seules des régions géniques codantes bien délimitées sont transcrites. La mise en évidence de la transcription des introns a légèrement nuancé ce propos sans pour autant l'affecter.

Au début des années 1990, des petits ARN non codants sont identifiés chez le nématode, mais ce n'est qu'en 2001 qu'une fonction de régulateurs biologiques leur est associée : l'interférence ARN ou ARNi (Fire et al., 1998). Cette découverte marque le début de la notion d'ARN régulateur. Cependant les ARN non codants sont restés très largement sous-estimés quantitativement et fonctionnellement. A la même époque, le projet « Génome Humain » prédit l'existence de plus de 100 000 gènes chez l'Homme alors que seulement 20 000 sont identifiés (Lander et al., 2001). L'amélioration des techniques de détection et de séquençage à haut débit du transcriptome a permis de révéler l'existence d'un nombre considérable de transcrits non-codants, montrant ainsi que la transcription par l'ARNPII est

un phénomène ubiquitaire et que l'immense majorité des génomes est transcrite. Ces données ont rendu caduque et simpliste la conception de l'organisation du génome en exposant un niveau supplémentaire de complexité de la régulation de son expression.

1.1.1.L'ARN polymérase II et son domaine carboxy-terminal ou CTD

L'ARNPII est un complexe protéique enzymatique de grande taille composé de douze sous-unités (Rpb1 à 12) hautement conservées dans le domaine eucaryote. Le brin d'ADN à transcrire, ou brin matrice, se fixe au cœur de ce complexe, dans une poche où est catalysée la polymérisation de l'ARN. L'étude de la structure de l'ARN polymérase II (Cramer et al., 2001) montre que le point de sortie de l'ARN synthétisé est localisé à proximité du domaine CTD (C Terminal Domain) de la sous-unité Rpb1 qui est lui-même impliqué dans le recrutement de différents facteurs co-transcriptionnels. Le CTD de l'ARNPII est un domaine non structuré mais très conservé. Il se compose de répétitions en tandem de l'heptapeptide Y₁-S₂-P₃-T₄-S₅-P₆-S₇, dont le nombre varie selon les espèces (26 chez la levure, 52 chez les mammifères) (Chapman et al., 2008). Au cours de la transcription, le CTD fait l'objet de différentes modifications post-traductionnelles qui sont impliquées dans la régulation du passage d'une phase transcriptionnelle à une autre. Il a été montré que les trois sérines (2, 5 et 7), ainsi que la tyrosine 1 et la thréonine 4 sont phosphorylées, et que les prolines peuvent subir une isomérisation. Les combinaisons multiples de ces modifications ont permis d'élaborer le « code CTD » (Buratowski, 2003). Des heptapeptides consécutifs d'un même CTD peuvent être différenciellement modifiés, renforçant ainsi la complexité du « code » (Schüller et al., 2016). La phosphorylation des sérines 5 et 2 du CTD sont les modifications les plus fréquentes et dont le rôle est le mieux compris (Harlen and Churchman, 2017 ; Fig. 1.1). Lors de l'initiation de la transcription, l'ARNPII est recrutée au promoteur sous sa forme non phosphorylée. Les sérines 5 du CTD sont phosphorylées en fin de phase d'initiation, par la kinase Kin28 du facteur TFIIH, ce qui participe au recrutement des facteurs d'épissage et de la coiffe en 5'. La phosphorylation des sérines 2 marque quant à elle le début de la phase d'élongation. Elle est majoritairement produite par Ctk1 (Cdk12/Cdk13) mais aussi par Bur1 (complexe

PTEF-b), plus accessoire dans ce mécanisme (Bataille et al., 2012). Elle autorise d'une part l'entrée en phase d'élongation processive, mais permet également le recrutement de facteurs d'élongation, de contrôle qualité, de poly-adénylation et d'export des ARNm. Une étude systématique à large échelle des modifications du CTD a montré une forte interdépendance des kinases qui le régule (Bataille et al., 2012). De plus, ces modifications sont très hétérogènes, tant dans leur mode de régulation, que dans leur combinaison les unes avec les autres. Le « code CTD » qui en résulte conserve des zones d'ombre dans ses mécanismes de coordination du cycle transcriptionnel. Enfin, le CTD est déphosphorylé lors de la phase de terminaison ce qui favorise le recyclage de l'ARNPII. L'ARNPII dépourvue de CTD peut transcrire l'ADN *in vitro* (Buratowski and Sharp, 1990), cependant le CTD est un domaine essentiel à la survie cellulaire. Parallèlement, l'ARNPII et les facteurs de transcription généraux sont suffisants pour produire un transcrit *in vitro* mais des cofacteurs sont nécessaires à la transcription *in vivo* (Reese, 2003). Le CTD apparaît ainsi comme une plateforme de recrutement pour les différents cofacteurs qui régulent la transcription dans l'espace nucléaire et au cours du cycle transcriptionnel (Harlen and Churchman, 2017; Jeronimo et al., 2013).

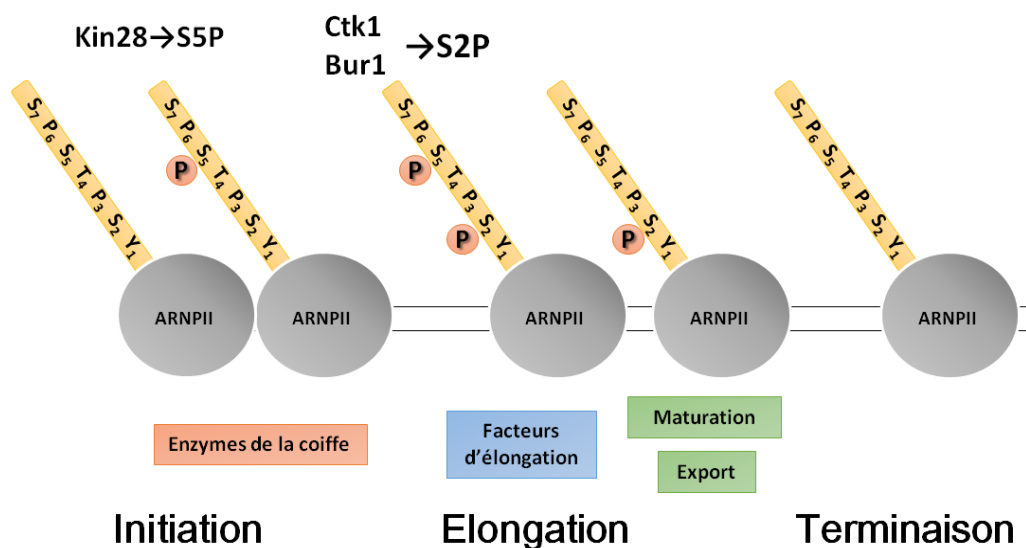


Figure 1.1 : Profil de phosphorylation des sérines 2 et 5 du CTD de l'ARNPII

Au cours du cycle transcriptionnel, la phosphorylation des sérines 5 (par Kin28) et 2 (par Ctk1 et Bur1) du CTD est régulée de façon dynamique et permet le recrutement de cofacteurs transcriptionnels.

1.1.2.Cycle transcriptionnel canonique d'un ARNm

La transcription par l'ARNPII est divisée en trois étapes très bien régulées : l'initiation, l'élongation et la terminaison. La phase d'initiation débute par la formation du complexe de pré-initiation ou PIC, composé de l'ARNPII et de facteurs de transcription généraux TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH. Le complexe TFIID, constitué entre autres de la TBP (TATA-Binding Protein), reconnaît et se fixe à la séquence promotrice du gène. Il agit ensuite comme une plateforme pour le recrutement séquentiel de TFIIA et TFIIB, puis de TFIIIF et de l'ARNPII. Enfin, TFIIE et TFIIH sont recrutés, et l'activité translocase de TFIIH permet l'ouverture de la bulle transcriptionnelle (Fishburn et al., 2015; Reese, 2003). *In vivo*, l'assemblage de ce PIC minimal n'est pas suffisant pour initier la transcription; la participation de co-activateurs tels que les complexes SAGA et Médiateur, ainsi que des facteurs de remodelage de la chromatine (voir 1.3) est nécessaire (Sikorski and Buratowski, 2009). En fin de phase d'initiation, la machinerie transcriptionnelle commence à synthétiser un fragment d'ARN de quelques nucléotides, on parle d'échappée du promoteur. Il a été montré *in vitro* que cette étape est souvent précédée de plusieurs cycles d'initiation abortive (Hsu, 2009).

La phase d'élongation transcriptionnelle correspond à la synthèse de l'ARNm. Elle est régulée initialement par le mécanisme de « promoter pausing », qui n'est pas décrit chez *S.cerevisiae* mais très conservé de la drosophile à l'homme (Adelman and Lis, 2012). NELF (Negative Elongation Factor) et DSIF (DRB-sensitivity-inducing Factor) sont recrutés après l'échappée du promoteur et inhibent la transcription. Le facteur DSIF est composé des protéines Spt4 et Spt5. Il interagit avec l'ARNPII et permet le recrutement de NELF. Le rôle de la pause en 5' n'est pas clairement établi mais il est suggéré qu'elle correspond à un point de contrôle favorisant le recrutement de facteurs nécessaires à l'élongation processive. Elle permet également une induction rapide de la transcription, notamment au niveau des gènes de choc thermique (Li et al., 1996). Le recrutement de PTEF-b (Positive Transcription Elongation Factor-b), qui phosphoryle les domaines C-terminaux de l'ARNPII et de Spt5, conduit ensuite au relargage de NELF et à l'entrée en élongation processive (Jonkers et al., 2014). Chez la levure, Bur1/Bur2 sont les

homologues de PTEF-b. Bur1 phosphoryle Spt5 et favorise le recrutement de Ctk1 qui phosphoryle à son tour le CTD de l'ARNPII (Brès et al., 2008). L'ARNPII en complexe avec DSIF poursuit l'élongation en collaboration avec des facteurs d'élongation tels que le complexe TFIIIS et PAF, des régulateurs de la structure de la chromatine, mais également des protéines impliquées dans la maturation et le contrôle qualité des ARNm (Harlen et al., 2016).

Enfin, la terminaison de la transcription permet de cliver l'ARNm et de le libérer de la machinerie transcriptionnelle. Après le codon STOP, des séquences de la région 3'UTR (UnTranslated Region) permettent le recrutement des facteurs de clivage et de polyadénylation. Deux modèles de terminaison sont proposés : le modèle « allostérique » selon lequel le recrutement des facteurs de poly-adénylation altère physiquement la stabilité du complexe transcriptionnel conduisant à l'arrêt de la transcription ; et le modèle « torpédo » qui propose un clivage endonucléolytique du transcrit suivi de la polyadénylation de son extrémité 3'. Le brin d'ARN résiduel serait dégradé à partir de son extrémité 5' jusqu'à la dissociation de l'ARNPII (Buratowski, 2005). La transcription est donc un mécanisme complexe au cœur duquel évolue l'ARNPII, dont la fonction est régulée négativement ou positivement par le recrutement d'un grand nombre de co-facteurs, tout au long du cycle transcriptionnel.

1.1.3. La transcription non-codante

La transcription de molécules d'ARN qui ne codent pas pour des protéines est depuis longtemps connue ; les ARNt, ARNr, snARN et snoARN ont été identifiés et associés à des rôles biologiques précis. Mais au cours des vingt dernières années, des études globales supportées par des techniques de haut débit ont mis en évidence l'existence d'un très grand nombre de transcrits non codants jusqu'alors inconnus, et qui n'ont pas nécessairement de fonction biologique. La transcription par l'ARNPII est aujourd'hui qualifiée de « pervasive », c'est-à-dire qu'elle serait à l'origine d'un bruit de fond transcriptionnel aléatoire et étendu à la majorité du génome.

En 2005, une étude chez la levure met en évidence une forte accumulation de transcrits dit cryptiques, les CUT (Cryptic Unstable Transcripts), dans des mutants de l'exonucléase Rrp6 (Wyers et al., 2005). Rrp6 est une sous-unité catalytique de l'exosome nucléaire, responsable notamment de la dégradation de fragments d'ARN au cours de la maturation liée à la terminaison transcriptionnelle des ARN (Kim et al., 2004), mais également de la dégradation d'ARNm aberrants (Bousquet-Antonelli et al., 2000). L'analyse des transcrits de mutants *rrp6Δ* a révélé un grand nombre de transcrits, intergéniques ou superposés aux régions géniques connues, constamment produits et immédiatement dégradés dans la cellule. Ces données remettent en question la précision du mécanisme de transcription par l'ARNPII. Successivement, d'autres types de transcrits non codants sont identifiés, les SUT (stable Unannotated Transcripts) ou encore les XUT (Xrn1-sensitive Unstable Transcripts), pouvant provenir de régions géniques, intergéniques, ou résultant d'une bidirectionnalité de l'ARNPII au niveau des promoteurs des gènes (Neil et al., 2009; van Dijk et al., 2011).

Chez les mammifères, le projet ENCODE a également permis d'exposer la nature ubiquitaire de la transcription (Djebali et al., 2012). De manière intéressante, beaucoup de transcrits non codants proviennent de régions régulatrices « promoter » ou « enhancer », et sont respectivement nommés PROMPT (promoter upstream transcripts) et eRNA (enhancer RNA) (Kim et al., 2010). Il est suggéré qu'ils pourraient avoir un rôle dans la régulation de la transcription, par exemple en recrutant directement des facteurs comme le médiateur. En effet, si les ARN non codants sont largement considérés comme du bruit de fond transcriptionnel, la multiplication des études sur le sujet a fait émerger la question d'un potentiel rôle fonctionnel qui fait aujourd'hui débat. Les analyses des fonctions biologiques de différents ARN non codants mettent en évidence des mécanismes d'actions variés, qui s'étendent de la modulation d'une fonction protéique à un rôle dans l'épissage ou encore une fonction de régulateur local de l'expression génique (Wilusz et al., 2009). Dans le contexte de pathologies diverses et notamment concernant le processus de cancérogénèse, les ARN non codants ont été impliqués tant pour leur rôle causal (dans les mécanismes de prolifération, d'angiogenèse, de migration...) que pour leur intérêt en tant que biomarqueurs (Schmitt and Chang, 2016).

Chez la levure, un grand nombre d'études effectuées sur des ARN non codants spécifiques montre que leur transcription a un rôle régulateur en modifiant localement l'environnement chromatinien; le transcrit non codant produit n'aurait quant à lui pas de rôle déterminé dans ce cas. Par exemple au locus *SRGI-SER3* de levure, la transcription de l'ARN non codant *SRGI* au niveau du promoteur altère l'initiation transcriptionnelle de *SER3* (Martens et al., 2005), on parle d'interférence par transcription. La transcription non codante peut également permettre de recruter des régulateurs chromatinien. Au gène *PHO84* par exemple, la production d'ARN antisens conduit à une modification épigénétique locale qui participe à la répression de la transcription canonique du gène (Camblong et al., 2007). Enfin, une étude récente a montré que la transcription opportuniste d'ARN non codants au locus *GAL* pouvait ou non avoir un rôle de répresseur transcriptionnel en fonction des conditions métaboliques des cellules (Lenstra et al., 2015). Cette étude soutient l'hypothèse que la transcription non codante ubiquitaire serait une forme primitive de mécanisme de répression transcriptionnelle locale.

Enfin, il existe une variété de transcrits cryptiques qui proviennent de régions géniques et correspondent à une version tronquée d'un ARNm. Ces ARN non codants n'ont pas de fonction biologique avérée. Historiquement, ce sont les premiers transcrits cryptiques qui ont été observés chez *S.cerevisiae* en 2003, dans des mutants des facteurs Spt6 et Spt16 dont la structure de la chromatine des régions codantes est affectée (voir partie 4). Ceci donne lieu à l'apparition d'ARN intragéniques qui ont été observés pour la première fois par Northern Blot à quelques loci (Kaplan et al., 2003). Il a par la suite été montré que ce phénomène d'initiation transcriptionnelle intragénique aberrante est largement étendue dans le génome de la levure en cas de défauts chromatinien, et que certains de ces transcrits cryptiques sont traduits en protéines (Cheung et al., 2008). Dans les cellules souches murines, des défauts de régulation de la chromatine conduisant à la modification du programme d'expression des gènes de pluripotence, associée à l'apparition de transcription cryptique intragénique. Ceci se traduit par une induction de la différenciation cellulaire (Xie et al., 2011). Enfin, chez *S.Pombe*, des analyses à haut débit ont mis en évidence qu'une désorganisation de la chromatine induit une augmentation importante de la transcription cryptique intragénique, intergénique mais aussi antisens (DeGennaro et al., 2013).

L'ensemble de ces données soutient la notion de bruit de fond transcriptionnel induit par l'ARNPII qui est atténué à posteriori par des complexes cellulaires comme l'exosome, ou bien qui est réprimé en amont par une organisation précise du génome sous forme de chromatine, garant de l'homéostasie transcriptionnelle. Ainsi, la structure de la chromatine permet de baliser le mécanisme transcriptionnel en orientant et en guidant l'ARNPII afin de limiter la production de transcrits cryptiques opportunistes (Fig. 1.2).

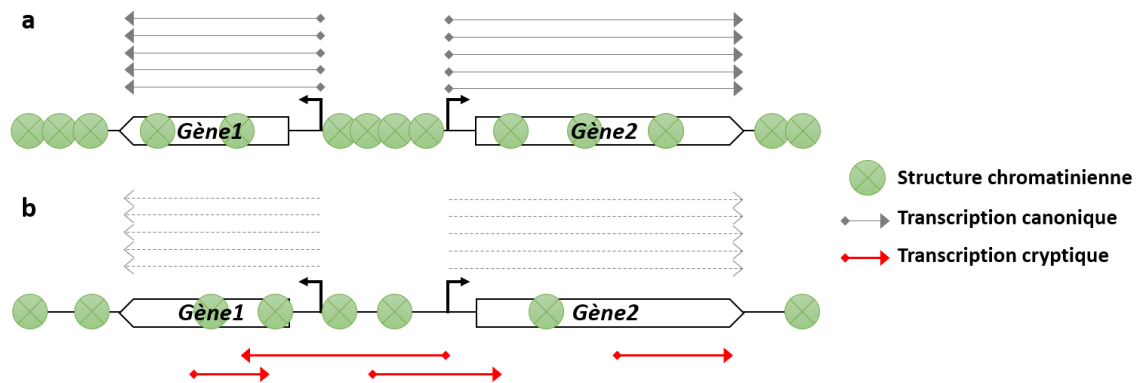


Figure 1.2 : La chromatine garantit l'homéostasie transcriptionnelle

a- L'organisation de la chromatine participe à l'orientation du mécanisme transcriptionnel en limitant l'accès à l'ADN vis-à-vis de l'ARNPII à des loci bien définis. b- La détérioration de l'organisation chromatinienne induit une perte de précision de la précision transcriptionnelle et l'accumulation de transcrits cryptiques issus de régions inter- ou intragéniques, et pouvant ou non affecter la transcription canonique.

1.2. La chromatine : organisation spatiale et fonctionnelle du génome

La chromatine est un complexe nucléoprotéique constituée d'ADN associé de façon structurée à des protéines histones. Les cellules eucaryotes possèdent un noyau de quelques microns de diamètre en moyenne, et l'ADN cellulaire est quant à lui d'une longueur totale d'environ 2 mètres. La fonction première de la chromatine a longtemps été considérée comme une fonction de compaction du long filament d'ADN dans ce noyau de petite taille. Cependant, l'observation de deux statuts chromatinien bien distincts confère également à la chromatine un rôle régulateur. En effet, on distingue l'euchromatine, forme relâchée et transcriptionnellement active, de l'hétérochromatine, forme très condensée et silencieuse. Il est montré que des fluctuations de ces états chromatinien sont intimement liées au

mécanisme transcriptionnel et ont une influence considérable sur le devenir cellulaire (Ricci et al., 2015).

1.2.1. La compaction de l'ADN

Il existe plusieurs niveaux d'organisation chromatinienne, de la structure la plus relâchée ou fibre de 10nm, jusqu'au chromosome mitotique qui est la forme la plus condensée (Fig. 1.3; Li and Reinberg, 2011; Maeshima et al., 2014). Le premier niveau correspond à la fibre de 10nm, également appelée nucléofilament ou structure « en collier de perles », du fait de son aspect en microscopie électronique. Il s'agit d'une forme linéaire et décondensée de la chromatine où les nucléosomes sont séparés par des fragments d'ADN libre. Concernant les niveaux d'organisation intermédiaires, la compaction du nucléofilament en fibre de 30 nm est aujourd'hui un paradigme remis en question.

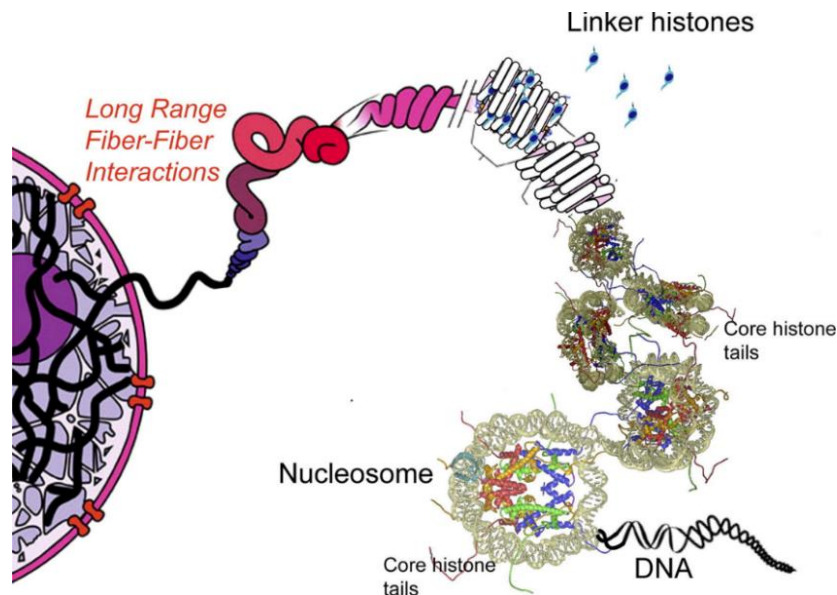


Figure 1.3 : Organisation de la chromatine

Représentation schématique des différents niveaux de compaction de l'ADN dans le noyau sous forme de chromatine (modifié de Chakravarthy et al., 2005).

En effet, la communauté scientifique a longtemps proposé ce niveau d'organisation secondaire, relativement stable, et atteint au travers d'interactions inter-nucléosomales proches ainsi qu'avec la participation des histones de liaison. Cependant, des études récentes indiquent que l'organisation chromatinienne est fondée sur des assemblages irréguliers et extrêmement dynamiques de la fibre de 10 nm (Fussner et al., 2012; Nishino et al., 2012). Des interactions entre des régions plus éloignées du génome constituent enfin un niveau de compaction tertiaire, dont l'organisation globale varie en fonction du type ou de la phase du cycle cellulaire (Bonifer, 1999; Woodcock and Dimitrov, 2001). Les technologies les plus actuelles permettent d'aborder la structure tridimensionnelle du génome dans le noyau et mettent en évidence l'importance fonctionnelle d'une telle organisation spatiale dans la régulation de l'information génétique (Bonev and Cavalli, 2016).

L'ADN ainsi organisé doit cependant rester accessible aux mécanismes de réplication, réparation, recombinaison et transcription. Il est donc nécessaire de décondenser la structure de la chromatine de façon très dynamique pour que des machineries complexes puissent accéder à l'ADN. L'organisation dynamique de la chromatine est conservée au cours de l'évolution, des organismes eucaryotes unicellulaires les plus simples comme les levures, jusqu'aux mammifères (Mariño-Ramírez et al., 2006). Afin d'assurer efficacement la dynamique chromatinienne, des facteurs protéiques spécifiques, incluant les enzymes qui modifient chimiquement les histones, les complexes de remodelage chromatiens ATP-dépendent, les variants d'histones et les chaperons d'histones, agissent de concert pour réguler des mécanismes tels que la transcription au sein de la chromatine.

1.2.2. Le nucléosome

L'organisation la plus relâchée de la chromatine, le « collier de perle », correspond à un enchainement de nucléosomes espacés par des fragments d'ADN de liaison ou ADN « linker » d'environ 50pb. Les nucléosomes sont la structure de base de la chromatine, constitués d'ADN enroulé autour d'un complexe de protéines histones. Cette structure et sa composition ont été proposées dès 1974 par une étude biochimique (Kornberg, 1974). Les

histones sont des protéines de faible poids moléculaire (environ 15 KDa), très bien conservées au cours de l'évolution. Ce sont des protéines basiques, chargées positivement, ce qui leur permet d'interagir fortement avec l'ADN chargé négativement.

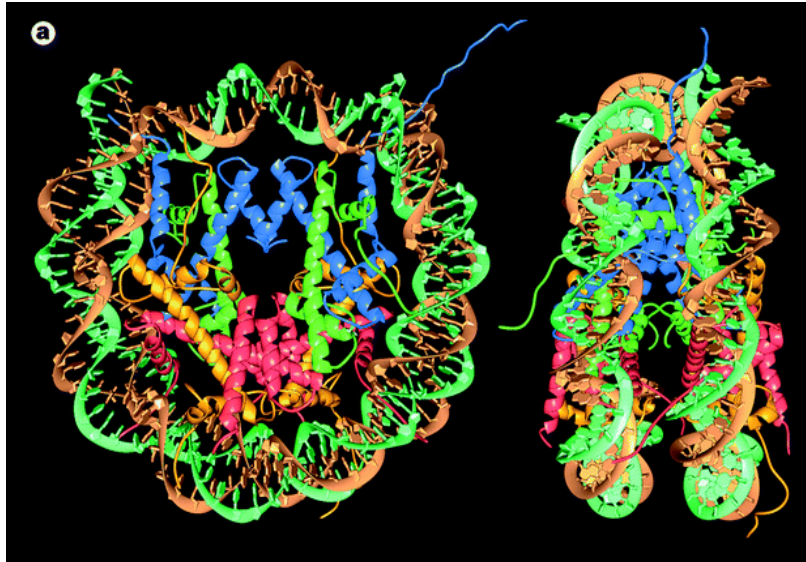


Figure 1.4 : Structure d'un nucléosome

Vue de face et de côté du complexe formé par un octamère de protéines histones autour duquel s'enroule 146pb d'ADN. La double hélice d'ADN est représentée en vert et brun. Les histones H2A sont représentées en orange, H2B en rose, H3 en bleu, et H4 en vert. Les α -hélices des histones sont positionnées au cœur du nucléosome alors que leurs extrémités N-terminales non structurées sont dirigées vers l'extérieur (Luger et al., 1997).

La première structure nucléosomale, à une résolution de 2,8Å, a été publiée en 1997, livrant des détails précis sur l'organisation moléculaire de la chromatine (Fig. 1.4; Luger et al., 1997). Le nucléosome correspond à 147pb d'ADN enroulé 1,65 fois autour d'un octamère de protéines histones, lui-même constitué de deux copies de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4. Plus exactement, un tétramère (H3-H4)₂ en position centrale, est encadré par deux dimères H2A-H2B de chaque côté pour former la structure sphérique de l'octamère d'histone autour de laquelle s'enroule l'ADN. Les histones possèdent toutes un domaine commun appelé « histone fold ». Il s'agit d'un motif protéique hélice-coude-hélice qui permet leur dimérisation. En revanche, les extrémités N-terminales des histones n'ont pas de domaines protéiques secondaires définis. Elles sont positionnées à l'extérieur du nucléosome et ne participent pas à sa structure. Les extrémités N-terminales sont flexibles,

riches en résidus basiques, et soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles (Kouzarides, 2007). Elles sont ainsi impliquées dans les niveaux les plus complexes de la condensation chromatinienne mais également dans la régulation de l'expression du génome (voir 1.3). Enfin l'histone H1, qui n'entre pas dans la composition de l'octamère d'histone, lie l'ADN de liaison à la sortie du nucléosome et participe aux niveaux supérieurs de compaction de la chromatine.

1.2.3. Positionnement des nucléosomes dans les régions codantes

Les nucléosomes ne sont pas localisés aléatoirement sur l'ADN et leur position est en soit un mécanisme régulateur pour tous les processus dont l'ADN est le substrat. La localisation nucléosomale dépend d'une part de la séquence nucléotidique de l'ADN, mais également de facteurs qui ont la capacité de déplacer ces structures (Radman-Livaja and Rando, 2010). Plusieurs études se sont attachées à cartographier la position des nucléosomes sur l'ensemble du génome. Pour cela, des techniques de séquençage à haut débit ont été utilisées suite à une digestion à la nucléase micrococcale ou MNase, couplée à une immunopurification des histones de la chromatine : MNase-ChIP. La MNase permet de digérer les fragments d'ADN inter-nucléosomiaux, et de ne conserver intact que l'ADN protégé par un nucléosome. L'alignement bioinformatique des séquences obtenues sur le génome de référence permet ensuite de déterminer précisément la position des nucléosomes (Fig. 1.5).

Chez la levure, ce type d'analyse a permis de mettre en évidence que 90% des promoteurs contiennent une région dépourvue en nucléosome d'environ 150 pb : le NFR (Nucleosome Free Region). Le site d'initiation de la transcription ou TSS (Transcription Start Site), est quant à lui occupé par un nucléosome très bien positionné appelé le nucléosome +1. En effet, sa localisation moyenne est constante dans une population de cellules donnée mais un peu plus variable chez les organismes complexes. De la même façon, un nucléosome -1 délimite le NFR en amont. Sur le corps des gènes, la localisation est moins bien définie car la chromatine est altérée régulièrement par l'ARNPII lors de la transcription (Mavrich et al., 2008a, 2008b; Schones et al., 2008).

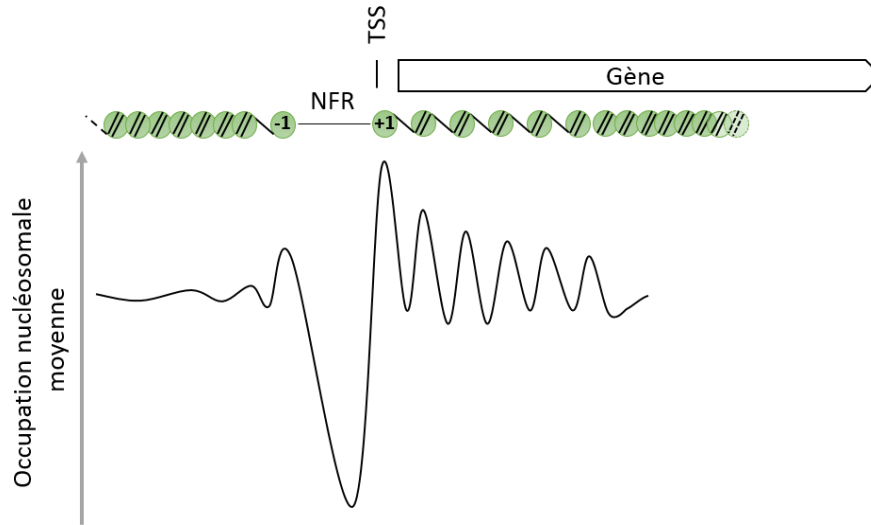


Figure 1.5 : Profil d'occupation des nucléosomes sur un gène

Représentation schématique de la localisation des nucléosomes sur une région codante associée au profil d'occupation nucléosomale. Ce type de profil est obtenu par une expérience de MNase-ChIP et un alignement sur le site d'initiation de la transcription ou TSS afin de représenter la position moyenne des nucléosomes sur l'ensemble des gènes. Les positions du NFR et des nucléosomes +1 et -1 sont bien définies et constantes à l'échelle du génome.

Le profil de localisation des nucléosomes en 5' des régions codantes est très conservé, mais il existe une certaine variabilité selon les organismes. Par exemple chez la levure, le nucléosome +1 est localisé en moyenne 50pb avant le TSS (Mavrich et al., 2008a) alors que chez la drosophile, il se situe environ 100pb en aval (Mavrich et al., 2008b). D'autre part, l'occupation et le positionnement des nucléosomes dans la région 5' d'un gène sont associés au mode de régulation de son expression (de Jonge et al., 2017; Tirosh and Barkai, 2008; Zhang et al., 2016). En effet, un certain nombre de régions promotrices sont occupées par des nucléosomes au niveau du TSS. On oppose ainsi les promoteurs ouverts, correspondant principalement aux gènes constitutivement exprimés, aux promoteurs fermés, qui sont partiellement occupés par des nucléosomes qui participent ainsi à la régulation négative de l'initiation transcriptionnelle et à la modulation de l'expression génique (Cairns, 2009). L'organisation de la chromatine, du fait du positionnement des nucléosomes, régule donc la transcription par l'ARNPII. Il a d'ailleurs été montré que la conservation d'un profil de positionnement bien défini des nucléosomes dans les régions promotrices est cruciale pour limiter la transcription antisens à partir des TSS (Whitehouse et al., 2007; Yadon et al., 2010). Ces études démontrent que la perte du complexe de

remodelage Isw2 entraîne un changement drastique du positionnement des nucléosomes. La désorganisation du paysage nucléosomal est à l'origine de l'accumulation de transcrits cryptiques, soulignant l'importance de la chromatine dans la prévention d'événements de transcription aberrants et donc dans le maintien de l'homéostasie transcriptionnelle.

1.2.4. Dynamique des nucléosomes : l'échange d'histones

Les nucléosomes sont une barrière physique aux mécanismes qui nécessitent un accès direct à l'ADN; la structure de la chromatine doit donc pouvoir s'adapter de façon dynamique selon les besoins cellulaires. Pour cela, contrairement à des structures stables et permanentes, les nucléosomes sont en réalité à l'équilibre constant entre leur assemblage et leur désassemblage. L'assemblage du nucléosome se fait de manière séquentielle. En effet, il a été montré que les tétramères (H3-H4)₂ se lient d'abord à l'ADN et que les dimères H2A-H2B sont recrutés dans un second temps pour former un nucléosome complet (Wilhelm et al., 1978). De la même façon, lors du désassemblage, il peut y avoir une éviction soit partielle, soit totale du nucléosome (Böhm et al., 2011).

Au cours de la phase S du cycle cellulaire, le matériel génétique est répliqué. Afin d'empaqueter sous forme de chromatine le nouveau brin d'ADN synthétisé, beaucoup d'histones nouvellement produites dans la cellule sont alors incorporées à la chromatine. Mais il a également été démontré que les nucléosomes sont dynamiques indépendamment de la phase répllicative. Les premières évidences d'un « turnover » ou échange des protéines histones en dehors de la phase S du cycle cellulaire proviennent des travaux de Vaughn Jackson au début des années 1980. L'utilisation d'acides aminés radioactifs a permis de discriminer les histones radiomarquées nouvellement synthétisées dans la cellule, des anciennes histones non marquées. Cette étude a ainsi mis en évidence des nucléosomes hybrides, formés à la fois d'histones radioactives et d'histones froides, révélant que les dimères H2A-H2B sont plus rapidement échangés que les tétramères (H3-H4)₂, et ce de façon partiellement dépendante de la transcription (Jackson, 1990). Un peu plus récemment, des analyses de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ont confirmé ces observations en quantifiant les dynamiques des histones marquées à la GFP

(Green Fluorescent Protein). Ainsi H3-GFP et H4-GFP sont bien plus stables à la chromatine qu'H2B-GFP (Kimura and Cook, 2001).

Cette dynamique est partiellement dépendante de l'activité transcriptionnelle. Il est en effet facile d'imaginer que plus un gène est transcrit, plus les nucléosomes de la région codante seront mobilisés. Chez la levure, un système d'analyse a été développé pour différencier les anciennes histones des nouvelles. Dans ce système, la synthèse de nouvelles histones est inductible et génère des histones étiquetées avec un épitope différent de celui porté par les anciennes histones (Rufiange et al., 2007). Des analyses de ChIP dans ce système, en phase G1 du cycle cellulaire, ont permis de montrer que H2B est très dynamique dans la chromatine de régions transcriptionnellement actives ou silencieuses. La dynamique de l'histone H3 est en revanche beaucoup plus faible. Cependant, cette étude a révélé une différence fondamentale entre les régions promotrices et les régions codantes. En effet, les histones H3 sont retenues sur la chromatine en dépit de la transcription, alors que leur niveau d'échange au promoteur est beaucoup plus élevé à l'exception toutefois des gènes les plus fortement transcrits qui échangent plus rapidement les histones H3 sur leurs séquences codantes (Rufiange et al., 2007). Une autre étude a par la suite proposé une technique comparable, permettant de différencier les anciennes histones des nouvelles, qui repose sur la conversion de l'étiquette d'une même histone, inductible au niveau du génome (Verzijlbergen et al., 2010). Le RITE (recombination-induced tag exchange), a ainsi permis de confirmer le profil de dynamique des histones H3 dans des conditions d'expression natives et endogènes. Ce phénomène participerait à la conservation d'une structure fluide de la chromatine au niveau des promoteurs pour faciliter l'initiation transcriptionnelle. Chez les eucaryotes supérieurs, l'incorporation spécifique du variant d'histone H3.3 dans les régions promotrices et les gènes des régions activement transcrites contribue également à ce mécanisme (Szenker et al., 2011). L'ensemble de ces observations souligne que l'échange d'histones dans la chromatine peut concerner le nucléosome entier ou l'affecter seulement partiellement. Il est important de souligner que de façon notable, les tétramères (H3-H4)₂ présents à l'intérieur des régions transcrites sont peu échangés, très rarement divisés mais plutôt recyclés dans leur intégralité lors de la transcription (Katan-Khaykovich and Struhl, 2011; Xu et al., 2010). Cela contribue à la stabilité de l'épigénome dans les régions codantes.

1.2.5.Chromatine et épigénétique

En plus de l'importance des histones dans la formation des nucléosomes et donc dans la compaction et l'organisation chromatinienne, les protéines histones peuvent subir un grand nombre de modifications, notamment sur leur extrémité N-terminale. Les modifications chimiques de la chromatine altèrent ses propriétés et peuvent également jouer un véritable rôle signalétique impliqué dans la régulation des mécanismes de réparation, réplication et transcription. Il existe de plus des variants d'histones également impliqués dans ces mécanismes de régulation du fait de leurs propriétés particulières. La découverte de ces mécanismes, qui modifient la chromatine et la lecture de l'ADN sans en altérer la séquence, a ouvert des horizons multiples concernant la régulation épigénétique du génome. En 1942, le scientifique et philosophe Conrad Waddington est le premier à proposer le terme d'épigénétique pour définir une discipline de recherche qui étudie les mécanismes qui relient le génotype au phénotype au cours de l'embryogénèse et du développement. Il propose que l'épigénétique englobe l'ensemble des processus régulateurs qui à partir d'un même matériel génétique de départ, une même séquence d'ADN, façonnent différents phénotypes (Waddington, 1942). A la fin des années 1980, la notion d'héritabilité des caractères épigénétiques leur accorde une place fondamentale dans la régulation génique (Holliday, 1994). On sait aujourd'hui que ces mécanismes regroupent la méthylation de l'ADN sur ces îlots CpG (séquences riches en nucléotides de type cytosine et guanidine), mais également les modifications post-traductionnelles des protéines histones, l'incorporation de variants d'histones, et de façon générale les mécanismes régulateurs de l'architecture chromatinienne qui seront décrits dans le chapitre suivant.

1.3.Différents mécanismes régulent la structure de la chromatine

En réponse aux besoins spécifiques des cellules d'accéder à leur information génétique, l'organisation de la chromatine est régulée de façon très dynamique. Selon la phase du cycle cellulaire, la réplication ou la réparation de l'ADN, l'activité transcriptionnelle des

gènes, plusieurs mécanismes coopèrent pour faciliter ou restreindre l'accès au génome. Ces facteurs ou mécanismes régulateurs sont divisés en quatre groupes en fonction de leur mode d'action : Les modifications post-traductionnelles des histones, les variants d'histones, les facteurs de remodelage ATP-dépendant et les chaperons d'histones. Ils permettent de définir le positionnement, la densité, la composition et la stabilité des nucléosomes sur la chromatine, influençant ainsi l'interprétation du génome.

1.3.1. Les modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications post-traductionnelles (PTM) des histones ont lieu majoritairement sur leurs extrémités N-terminales, riches en acides aminés basiques et accessibles, car positionnées en périphérie du nucléosome. Dans une moindre mesure, des modifications covalentes des domaines central et C-terminal ont également été recensées (Bannister and Kouzarides, 2011; Tessarz and Kouzarides, 2014). Ces modifications chimiques sont très dynamiques et les enzymes qui catalysent leur ajout ou leur retrait sur la chromatine sont nombreuses et bien caractérisées. On rapporte principalement des événements de méthylation des lysines et des arginines, l'acétylation, l'ubiquitination et la sumoylation des lysines et la phosphorylation de résidus sérine, thréonine et tyrosine (Bannister and Kouzarides, 2011 ; Fig. 1.6), impliquées dans divers processus cellulaires.

Les modifications covalentes des histones modulent la chromatine de deux façons distinctes : en modifiant d'une part la stabilité des interactions entre les nucléosomes et l'ADN ou des interactions inter-nucléosomales; et d'autre part, en jouant un rôle signalétique permettant notamment le recrutement d'autres facteurs chromatinien. Dans le premier cas par exemple, l'acétylation des histones sur leurs résidus lysines permet de neutraliser leur charge positive et d'affaiblir ainsi l'interaction électrostatique entre l'ADN et les nucléosomes (Grunstein, 1997; Hong et al., 1993). La chromatine hyperacétylée est globalement associée aux régions activement transcrites du génome mais l'acétylation joue également un rôle dans les processus de réplication (Unnikrishnan et al., 2010) et de réparation de l'ADN (Ramanathan and Smerdon, 1989; Xu and Price, 2011). D'autre part, l'incorporation d'une histone H4 modifiée chimiquement et constitutivement acétylée sur la

lysine 16 (H4K16ac) inhibe la condensation chromatinienne (Shogren-Knaak et al., 2006). L'acétylation est donc également impliquée dans l'organisation des structures secondaires de la chromatine et dans sa compaction.

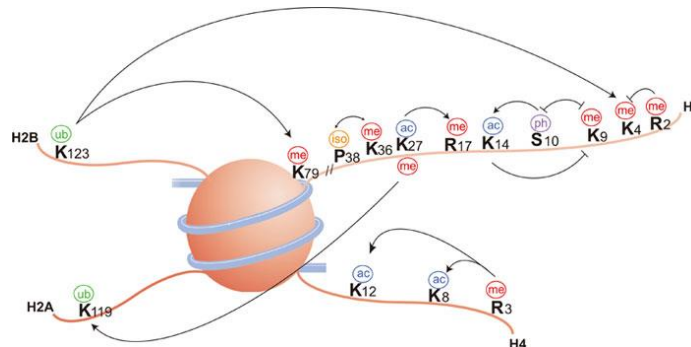


Figure 1.6 : Les principales modifications post-traductionnelles des histones

Principales modifications post-traductionnelles des histones, résidus affectés et inter-dépendance entre certaines marques (adapté de Bannister and Kouzarides, 2011)

Le deuxième mode d'action des marques d'histone est de permettre le recrutement de facteurs modulateurs de la chromatine. En effet, les facteurs de remodelage de la chromatine possèdent des domaines protéiques structuraux qui permettent la reconnaissance spécifique de certaines marques épigénétiques (Musselman et al., 2012). Par exemple, les chromodomaines reconnaissent les marques de méthylation alors que les bromodomaines reconnaissent les marques d'acétylation. Les modifications des histones permettent donc le ciblage de ces facteurs au niveau des régions transcrites, ou lors des événements de réplication ou de réparation de l'ADN, pour moduler la structure de la chromatine en fonction du besoin. Plusieurs modifications peuvent coexister sur la même histone ou sur les histones adjacentes d'un même nucléosome, rendant parfois complexe l'interprétation de ces signaux. Une forme de dépendance entre différentes marques a été mise en évidence (Fig. 1.6). Par exemple, la phosphorylation de H3S10 promeut son acétylation sur K14 (Lo et al., 2000). Il a donc été proposé qu'une inter-complémentarité entre ces marques aboutit à un véritable « code des histones » (Strahl and Allis, 2000) qui participe à la régulation des mécanismes cellulaires. Cette complémentarité est notamment illustrée par la capacité de certains facteurs à identifier une marque via deux domaines distincts ou par exemple à cibler préférentiellement une modification quand elle est accompagnée d'une autre marque d'histone associée (Yun et al., 2011).

1.3.2. Les variants d'histones

Les histones canoniques H2A, H2B, H3 et H4 sont synthétisées lors de la phase S du cycle cellulaire. Cette phase répliquative nécessite de nouvelles protéines histones pour compacter le brin d'ADN nouvellement synthétisé. Des isoformes des histones canoniques, appelées variants d'histones, peuvent être synthétisées tout au long du cycle cellulaire et incorporées dans la chromatine indépendamment de la réplication. L'incorporation de variants d'histones pour remplacer les histones canoniques permet de modifier la composition des nucléosomes et ainsi d'altérer la structure de la chromatine. Même si les variants d'histones possèdent une forte homologie de séquence avec les histones canoniques, leurs propriétés biochimiques diffèrent et leur incorporation dans les nucléosomes peut affecter leur stabilité (Kamakaka and Biggins, 2005; Talbert and Henikoff, 2017).

L'histone H3 possède deux variants majeurs: CenH3 (Centromeric H3) et H3.3. Le variant d'histone H3 centromérique est connu sous le nom de CENP-A chez l'homme et Cse-4 chez *S.cerevisiae*. Il est spécifique des centromères et est essentiel à l'assemblage des kinétochores et donc au bon déroulement de la ségrégation chromosomique lors de la division cellulaire (McKinley and Cheeseman, 2016; Steiner and Henikoff, 2015). Le variant H3.3 est bien caractérisé et se différencie de l'histone H3 canonique par seulement 4 résidus. Cette différence modeste ne semble pas affecter de façon majeure la stabilité et la structure du nucléosome, mais influence l'organisation secondaire de la chromatine en favorisant une conformation ouverte (Chen et al., 2013). H3.3 est incorporé aux nucléosomes au cours de la transcription. Son enrichissement dans la chromatine est associé aux régions transcriptionnellement actives et corrèle positivement aux niveaux d'ARNPII (Jin et al., 2009). Chez la levure, il n'existe qu'une seule forme d'histone H3 non centromérique très similaire à H3.3. Le profil de distribution d'H3.3 est conservé au cours de l'évolution et se traduit par une occupation des régions régulatrices, promotrices et codantes (Ray-Gallet et al., 2011; Rufiange et al., 2007; Shu et al., 2014).

L'histone H2A possède plusieurs variants dont les principaux sont H2A.Z et H2A.X; ils sont très conservés de la levure à l'homme. H2A.Z (Htz1 chez la levure) est incorporé indépendamment de la réplication et particulièrement enrichi dans les régions promotrices

(Zlatanova and Thakar, 2008), postulant d'un rôle facilitateur dans l'initiation transcriptionnelle. Il a par ailleurs été montré que les nucléosomes contenant les deux variants H2A.Z et H3.3 semblent moins stables et enrichis au voisinage des NFR (Jin et al., 2009). Le variant H2A.X est quant à lui réparti plus uniformément sur la chromatine et est au cœur de la signalisation en réponse à un dommage double-brin de l'ADN. Sa phosphorylation permet le recrutement rapide des machineries de réparation (Kamakaka and Biggins, 2005). Les fonctions des principaux variants d'histones sont résumées dans le tableau suivant.

Variants	Espèces	Effets sur la chromatine	Fonctions biologiques
MacroH2A	Vertébrés	Condensation	Inactivation du chromosome X
H2ABbd	Vertébrés	Décondensation	Activation transcriptionnelle
H2A.X	Ubiquitaires	Condensation	Réparation, Recombinaison, Répression transcriptionnelle
H2A.Z	Ubiquitaires	Condensation/Décondensation	Activation/Repression transcriptionnelle, Ségrégation chromosomique
CenH3	Ubiquitaires	-	Assemblage et fonction des kinétochores
H3.3	Ubiquitaires	Décondensation	Transcription

Tableau 1.1 : Variants des histones H3 et H2A et fonctions biologiques
(adapté de Kamakaka and Biggins, 2005)

1.3.3. Les complexes de remodelage chromatiniens ATP dépendants

1.3.3.1. Rôle biologique et mode d'action

Les complexes de remodelage de la chromatine sont généralement de grands complexes multi-protéiques qui possèdent une sous-unité catalytique contenant un domaine ATPase qui appartient à une famille d'hélicases ADN-dépendantes. Ils utilisent l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP pour moduler l'organisation de la chromatine en déplaçant, restructurant, déstabilisant ou en éjectant entièrement les nucléosomes (Fig. 1.7; Narlikar et al., 2013; Zhou et al., 2016). Tous les complexes de remodelage possèdent des caractéristiques communes : ils ont une grande affinité pour les nucléosomes ; leur capacité à altérer l'interaction ADN-histone est dépendante de leur domaine ATPase ; les complexes

de remodelage possèdent des domaines ou des sous-unités régulatrices qui modulent leur fonction ATPase ; ils interagissent tous avec d'autres acteurs de l'organisation de la chromatine ou des facteurs de transcription ; enfin, ils possèdent des domaines de reconnaissance de marques d'histones qui permettent de cibler leur action sur des régions spécifiques de la chromatine (Clapier and Cairns, 2009). L'action concertée des complexes de remodelage et des modifications post-traductionnelles des histones est l'origine principale de la dynamique de la chromatine.

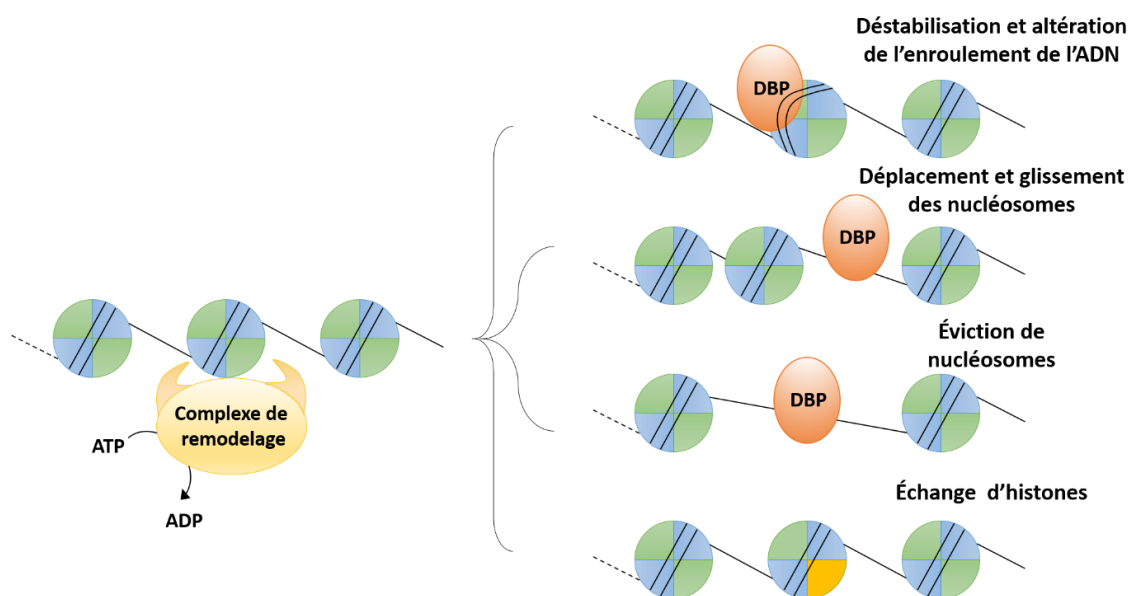


Figure 1.7 : Actions des complexes de remodelage chromatinien

L'hydrolyse de l'ATP permet aux facteurs de remodelage de favoriser l'accès à une région du génome en déroulant partiellement l'ADN enroulé autour des octamères d'histones, en déplaçant les nucléosomes sur la chromatine, ou en les éjectant totalement. Cela permet notamment la liaison de facteurs sur l'ADN ou DBP (DNA Binding Protein). Les complexes de remodelage ont également la capacité de modifier la composition des nucléosomes en incorporant des nouvelles histones ou des variants à la chromatine (inspiré de Tang et al., 2010).

Les complexes de remodelage permettent ainsi de déplacer les nucléosomes sur la chromatine, pour exposer une séquence vis-à-vis d'un facteur de liaison à l'ADN. Lors de la transcription ou de la réplication, ils sont essentiels au déplacement ou à l'éviction des nucléosomes exigés par le passage des polymérases. Ils collaborent dans ce mécanisme avec les chaperons d'histones afin de repositionner les nucléosomes dans le sillage des machineries de transcription ou de réplication. Enfin, ils sont également impliqués dans les

processus de réparation en autorisant l'accès au site du dommage à l'ADN à la machinerie de réparation (Fig. 1.7; Clapier and Cairns, 2009; Narlikar et al., 2013).

Pour ce qui est de leur mode de fonctionnement, il est proposé que ces complexes interagissent avec le nucléosome pour permettre une liaison du domaine ATPase à l'ADN enroulé autour de l'octamère d'histone. L'ADN sera alors déplacé induisant la formation d'une boucle à la surface du nucléosome (Bartholomew, 2014; Strohner et al., 2005; Zofall et al., 2006). La propagation de cette boucle permettrait le glissement du nucléosome sur la chromatine, sa déstabilisation ou son éviction.

1.3.3.2. Les classes de complexes de remodelage

Il existe quatre grandes familles de complexes de remodelage qui se distinguent par leur sous-unité catalytique, et plus spécifiquement par les domaines fonctionnels uniques adjacents au domaine ATPase. Ces familles sont : SWI/SNF (Mating type switching/Sucrose nonfermenting), ISWI (Imitation Switch), CHD (Chromodomain Helicase DNA binding) et INO80 (Inositol requiring) (Fig. 1.8 ; Clapier and Cairns, 2009).

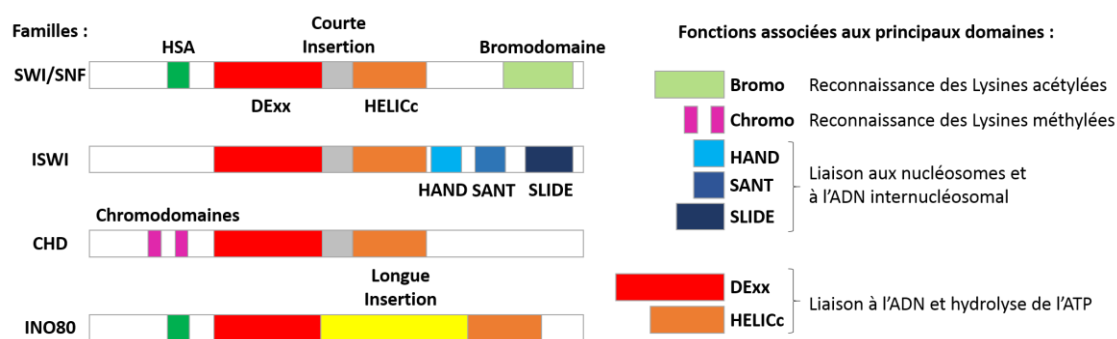


Figure 1.8 : Les sous-unités catalytiques des complexes de remodelage

Complexes de remodelage ATP-dépendants classés selon leur sous-unité catalytique et fonctions associées. Le domaine ATPase est très conservé et se divise en deux parties : DExx (rouge) et HELICc (orange). Le domaine ATPase des familles SWI/SNF, ISWI et CHD est interrompu par une courte insertion (gris) à la différence d'une longue insertion (jaune) pour la famille INO80. Chaque famille se distingue par des domaines adjacents qui leur confèrent une spécificité : un bromodomaine et un domaine HSA (helicase-SANT) pour la famille SWI/SNF, un module SANT-

SLIDE pour la famille ISWI, la famille CHD est caractérisée par deux chromodomaines positionnés en tandem, et un domaine HSA pour la famille INO80 (inspiré de Clapier and Cairns, 2009).

1.3.3.2.1. La famille SWI/SNF

Les complexes de remodelage de la famille SWI/SNF ont été identifiés chez la levure mais sont conservés au cours de l'évolution. Ils se caractérisent par la présence d'un bromodomaine qui permet la reconnaissance des lysines acétylées des histones et sont au nombre de deux chez *S.cerevisiae* : Swi/Snf (hBRM/BRG1 chez les eucaryotes supérieurs) et RSC (Remodel the Structure of Chromatin) (Mohrmann and Verrijzer, 2005). Le complexe Swi/Snf est le premier complexe de remodelage qui a été identifié. De façon générale, Swi/Snf est associé à une fonction d'activateur transcriptionnel (Sudarsanam et al., 2000; Wu and Winston, 1997).

Le complexe RSC a été identifié du fait de son homologie avec Swi/Snf mais il est plus abondant dans la cellule. Contrairement à ce dernier, il est essentiel à la viabilité cellulaire (Cairns et al., 1996). RSC est impliqué dans la réponse au stress et dans la ségrégation des chromosomes (Damelin et al., 2002; Kent et al., 2007). Swi/Snf et RSC ont tous deux un rôle au cours de la réparation des cassures double-brins (Chai et al., 2005). Enfin, sur le plan transcriptionnel, Swi/Snf et RSC ne sont pas impliqués dans la régulation des mêmes gènes. RSC semble réguler positivement ou négativement une plus grande proportion de gènes et est localisé au promoteurs des gènes de classe III (Mohrmann and Verrijzer, 2005; Ng et al., 2002).

Une étude sur l'ensemble du génome a mis en évidence que Swi/Snf et RSC sont majoritairement localisés en 5' au niveau des nucléosomes qui bornent le NFR, mais également au niveau des nucléosomes +2 et +3 (Yen et al., 2012). Ce profil de distribution est cohérent avec un rôle de remodelage des régions promotrices en faveur de l'initiation transcriptionnelle mais suggère également un rôle dans les stades précoces de l'élongation.

1.3.3.2.2.La famille ISWI

Les complexes de remodelage de la famille ISWI ont initialement été identifiés chez la drosophile (NURF, CHRAC, ACF). Il existe deux versions de leur sous-unité catalytique conservées de la levure à l'homme : Isw1 et Isw2 (chez la levure) et Snf2h et Snf2l (chez l'homme). Chez *S.cerevisiae*, il existe 3 complexes appartenant à cette famille, ISW1A, ISW1B et ISW2 (Bartholomew, 2014). Ces complexes ont été impliqués dans la transcription par les ARNP I, II et III mais également dans la régulation de la réplication et de la réparation (Erdel and Rippe, 2011). Les sous-unités catalytiques ISWI ne contiennent ni bromodomaine, ni chromodomaine, mais sont caractérisées par des domaines SANT et SLIDE qui peuvent lier l'ADN et les nucléosomes. Le principal mode d'action des complexes ISWI serait de déplacer les nucléosomes sur la chromatine par « glissement » afin de contrôler leur positionnement (Bartholomew, 2014). Chez la levure, il a été montré que ISW2 est principalement localisé au niveau des nucléosomes +1 (Yen et al., 2012) et organise leur positionnement au niveau du NFR des promoteurs pour limiter la transcription d'ARN non codants qui en est issue (Whitehouse et al., 2007; Yadon et al., 2010). Malgré un enrichissement en 5', la localisation du complexe ISW1 est cependant plus diffuse sur l'ensemble des nucléosomes que celle de ISW2 (Yen et al., 2012). Aussi, ISW1 joue un rôle essentiel dans la prévention de la transcription cryptique intragénique : en effet, en collaboration avec Chd1, ISW1 organise les nucléosomes sur le corps des gènes en favorisant d'une part leur bon positionnement (Gkikopoulos et al., 2011; Zhang et al., 2011), et d'autre part en limitant l'échange d'histones, et donc le niveau d'acétylation dans les régions transcrites (Smolle et al., 2012).

1.3.3.2.3.La famille CHD

La troisième famille de complexes de remodelage est la famille CHD, caractérisée par la présence de chromodomaines en tandem dans la partie N-terminale de leur sous-unité catalytique. Ces-derniers permettent la reconnaissance des lysines méthylées des histones (Clapier and Cairns, 2009). Chez la levure, cette famille ne comporte que le facteur Chd1 qui est conservé chez l'homme. Chd1 peut réguler positivement et négativement

l'expression des gènes. Il collabore étroitement avec Swi/Snf puisqu'il existe une létalité synthétique entre les mutants $\Delta chd1$ et $\Delta snf2$ ou $\Delta swi1/4$ (Tran et al., 2000). Enfin, Chd1 est principalement impliqué dans l'élongation transcriptionnelle : il est associé aux régions activement transcrites et interagit génétiquement avec des facteurs impliqués dans l'élongation tels que Spt16 et Set2 (Biswas et al., 2007). Dans ce contexte, il est démontré que la perte de Chd1 affecte le positionnement des nucléosomes sur les gènes (Zhang et al., 2011). De plus, chez la levure et la drosophile, Chd1 régule la dynamique des nucléosomes en favorisant l'incorporation des histones H3 nouvellement produites en 5' et limitant ce phénomène en 3' (Radman-Livaja et al., 2012). Dans cette fonction, Chd1 et ISW1 collaborent pour stabiliser les nucléosomes mobilisés par le processus transcriptionnel et maintenir ainsi l'état épigénétique des régions codantes (Smolle et al., 2012).

1.3.3.2.4. La famille INO80

Chez *S.cerevisiae*, la famille INO80 compte deux complexes : INO80 et SWR1. Le domaine ATPase des sous-unités catalytiques INO80 diffère des autres du fait de la présence d'une longue insertion entre les domaines DExx et HELICc (Fig. 1.8). Celle-ci permet la liaison des hélicases Rvb1 et 2 qui sont essentielles à l'intégrité fonctionnelle des complexes INO80 (Jónsson et al., 2004). INO80 est impliqué dans la régulation transcriptionnelle mais tient également un rôle important dans la réparation. En effet, la délétion des sous-unités catalytiques Ino80 et Swr1 provoque une hypersensibilité des levures vis-à-vis d'agents endommageant l'ADN (Shen et al., 2000; van Attikum et al., 2004). Le complexe SWR1 est quant à lui impliqué dans l'échange de l'histone canonique H2A et son remplacement par le variant H2A.Z (Kobor et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004).

1.3.4. Les chaperons d'histones

Les chaperons d'histones sont définis comme des protéines qui prennent en charge les histones libres dans la cellule et participent à l'assemblage des nucléosomes. Les histones sont des protéines très basiques qui ont une tendance à l'agrégation et aux interactions histone-ADN non spécifiques du fait de leur forte affinité pour les acides nucléiques. Les chaperons d'histones ont longtemps été considérés comme des facteurs passifs, dont la seule fonction était de lier les histones pour éviter leur agglomération sur l'ADN (Laskey et al., 1978). En réalité, ces facteurs sont essentiels à l'équilibre des mécanismes d'assemblage et de désassemblage des nucléosomes. Il existe de nombreux chaperons d'histones engagés dans des fonctions telles que le stockage et le transport des histones, leur modification post-traductionnelle, et l'assemblage-désassemblage des nucléosomes (Tableau 1.2 ; Hammond et al., 2017). De par ces fonctions multiples, les chaperons d'histones sont donc impliqués dans les mécanismes de transcription, de réplication et de réparation. Par exemple, le complexe chaperon FACT intervient durant la réplication et la transcription (Hsieh et al., 2013; Yang et al., 2016), alors que Spt6 semble spécifique à la transcription (Avvakumov et al., 2011).

Au cours de la réplication les histones sont en partie recyclées, mais la duplication du génome nécessite fortement l'incorporation d'histones nouvellement synthétisées pour organiser la chromatine suite au passage de la fourche de réplication. Le complexe hélicase MCM2-7 recrute FACT et Asf1 pour prendre en charge respectivement les dimères H2A-H2B et H3-H4 lors de leur éviction (Formosa, 2012; Gambus et al., 2006; Huang et al., 2015). FACT et Asf1 participent ensuite au recyclage de ces histones de façon aléatoire et semi-conservatrice sur les 2 brins d'ADN (Hammond et al., 2017), dans ce contexte, un tétramère (H3-H4)₂ peut être soit recyclé dans son intégralité, soit scindé en deux dimères H3-H4 (Xu et al., 2010). Le chaperon Vps75 est impliqué dans le dépôt d'histones H2A-H2B nouvellement produites, et CAF1 et Rtt106 sont quant à eux impliqués dans le dépôt des nouvelles histones H3-H4 (Li et al., 2008; Selth et al., 2009)

Histones	Chaperons	Fonctions
H3-H4	Asf1	<i>Import nucléaire - Réplication - Réparation - Transcription</i>
	CAF1	<i>Import nucléaire - Réplication - Réparation</i>
	Vps75	<i>Réplication</i>
	Nap1	<i>Transcription</i>
	Rtt106	<i>Réplication</i>
	Spt6	<i>Transcription</i>
	Spt2	<i>Transcription</i>
H3.3-H4	HIRA	<i>Transcription</i>
	Daxx	<i>Transcription</i>
	Asf1	<i>Transcription</i>
H2A-H2B	Nap1	<i>Import nucléaire - Transcription</i>
	FACT	<i>Réplication - Réparation - Transcription</i>
	Chz1	<i>Transcription</i>
H2A.Z-H2B	Nap1	<i>Transcription</i>
	Chz1	<i>Transcription</i>
H2A.X-H2B	FACT	<i>Réparation</i>

Tableau 1.2 : Les principaux chaperons d’histones et leurs implications fonctionnelles
(modifié de Avvakumov et al., 2011).

Au cours de la transcription, la dynamique des histones est différente dans les régions promotrices et dans les corps des gènes. Asf1 joue un rôle crucial dans la régulation de l’initiation transcriptionnelle en prenant en charge la dynamique de l’histone H3 sur les promoteurs (Rufiange et al., 2007). FACT influence la déstabilisation des histones H2A-H2B à ce niveau (Takahata et al., 2009). Dans le corps des gènes en revanche, FACT et Spt6 sont responsables de redéposer les histones dans le sillage de la transcription, constituant ainsi un des mécanismes majeurs du recyclage co-transcriptionnel des histones (Jamai et al., 2009; Kato et al., 2013). Asf1 contribue quant à lui à l’incorporation d’H3-H4 nouvellement synthétisées pour reconstituer les nucléosomes après le passage de l’ARNPII. Ainsi lors de l’élargissement transcriptionnelle, FACT, Spt6 et Asf1 sont essentiels à la reconstitution nucléosomale suite au passage de l’ARNPII, soit en recyclant les histones parentales, soit en incorporant de nouvelles histones à la chromatine.

Pour finir, les chaperons d’histones ont également un rôle dans la modification post-traductionnelle des histones, à la fois dans un contexte de chromatine mais aussi à l’état d’histones libres. En effet, Asf1 se lie aux histones H3 libres nouvellement synthétisées et est essentiel à leur acétylation sur la lysine 56 par l’acétyltransférase Rtt109 (Driscoll et al.,

2007). Dans un contexte chromatinien, il est proposé que Spt6 participe au recrutement de la méthyltransférase Set2 lors de l'élongation pour favoriser la triméthylation d'H3K36 (Youdell et al., 2008).

Des études thermodynamiques ont montré que seule une interaction correcte histone-ADN peut entrer en compétition avec l'interaction entre une histone et son chaperon. Ainsi, lors de la prise en charge des histones chromatinienne, les chaperons d'histones agiraient donc comme des « boucliers » qui inhibent les contacts aberrants avec l'ADN (Andrews et al., 2010, 2008). Ces interactions entre les chaperons et leurs histones n'étant pas exclusives, une même histone peut se lier à plusieurs chaperons, et à l'inverse un chaperon peut prendre en charge plusieurs histones. Par exemple le dimère H2A-H2B peut être pris en charge par NAP1 et FACT (D'Arcy et al., 2013; Hondele et al., 2013), et Nap1 peut chaperonner H2A-H2B et H3-H4 (Andrews et al., 2010). Cette redondance fonctionnelle complique encore aujourd'hui la compréhension des mécanismes de régulation qui gouvernent la fonction des chaperons d'histones dans les processus chromatiens. Enfin, des études chez les eucaryotes supérieurs ont mis en évidence le rôle capital des chaperons d'histones dans l'embryogénèse et le développement, ainsi que dans le processus de cancérogénèse chez l'homme (Burgess and Zhang, 2013; Filipescu et al., 2013), faisant du décryptage de leur fonction un enjeu majeur.

1.4.Mécanismes régulateurs de la chromatine au cours de la transcription

1.4.1.La transcription dans le contexte de la chromatine

Les nucléosomes sont répressifs vis-à-vis de la machinerie transcriptionnelle (Gaykalova et al., 2015). Les nombreux mécanismes décrits précédemment permettent de conserver une structure chromatinienne dynamique, fluide et modulable de façon à réguler la transcription.

Dans les régions promotrices, le positionnement et l'état épigénétique des nucléosomes participent à la supervision de l'initiation transcriptionnelle, des défauts d'organisation de

ces structures donnant lieu à l'accumulation de transcrits non-codants (Whitehouse et al., 2007). De la levure à l'homme, la densité des nucléosomes est généralement plus faible sur les promoteurs que dans le corps des gènes (Bernstein et al., 2004; Sekinger et al., 2005; Valouev et al., 2011). D'autre part, la forte incorporation d'H3K56ac dans les régions promotrices reflète une dynamique plus élevée et une chromatine plus ouverte à ces loci (Rufiange et al., 2007). Chez la levure, la plupart des promoteurs présente un NFR qui définit la zone d'assemblage du PIC (Mavrigh et al., 2008a; Venters and Pugh, 2009). Plusieurs mécanismes interviennent pour réguler la chromatine à ce niveau. Le complexe de remodelage RSC participe activement au maintien des NFR en écartant latéralement les nucléosomes (Badis et al., 2008; Hartley and Madhani, 2009). L'absence de RSC entraîne une accumulation indésirable de nucléosomes sur la région du TSS qui altère la transcription. Ce phénotype est supprimé par perte de ISW1, démontrant un antagonisme fonctionnel important de ces deux complexes à ce niveau (Parnell et al., 2015). Les histones qui composent les nucléosomes +1 et -1, qui délimitent le NFR, sont très fortement acétylées et échangées. Les complexes SAGA (Spt-Ada-Gcn5 Acétyltransférase) et NuA4 acétylent les histones des régions promotrices ce qui déstabilise les nucléosomes et facilite l'incorporation de H2A.Z aux nucléosomes +1 et -1 par le complexe SWR1 (Altaf et al., 2010), rendant les nucléosomes encore plus instables et sujets à l'éviction (Zhang et al., 2005). SAGA peut également favoriser le recrutement de Swi/Snf, qui reconnaît d'autre part les marques d'acétylation, et peut éjecter les nucléosomes du promoteur pour autoriser l'initiation transcriptionnelle (Qiu et al., 2016; Yoon et al., 2003). Ces mécanismes sont interdépendants dans leur ensemble et coopèrent pour créer un environnement chromatinien plus fragile et favorable à l'initiation de la transcription (Fig. 1.9).

La régulation de formation du PIC lors de l'initiation a longtemps été considérée comme l'étape limitante dans la régulation de l'expression des gènes. On sait aujourd'hui que la régulation de l'élongation transcriptionnelle est tout aussi importante. Ceci est notamment illustré par le fait que la machinerie transcriptionnelle est souvent déjà assemblée au promoteur de gènes inactifs, et le passage en phase d'élongation processive est déterminant dans la régulation de leur transcription. On parle d'état « poisé » en 5', c'est-à-dire « à l'équilibre », la machinerie transcriptionnelle est prête mais reste en attente après 40-50 pb pour poursuivre la transcription. Ce mécanisme permet une activation rapide et bien

synchronisée dans le temps de l'expression des gènes (Nechaev and Adelman, 2011). Il a d'abord été mis en évidence chez la drosophile au niveau des gènes de réponse aux chocs thermiques (Gilmour and Lis, 1986), mais est conservé chez l'humain (Kim et al., 2005; Muse et al., 2007).

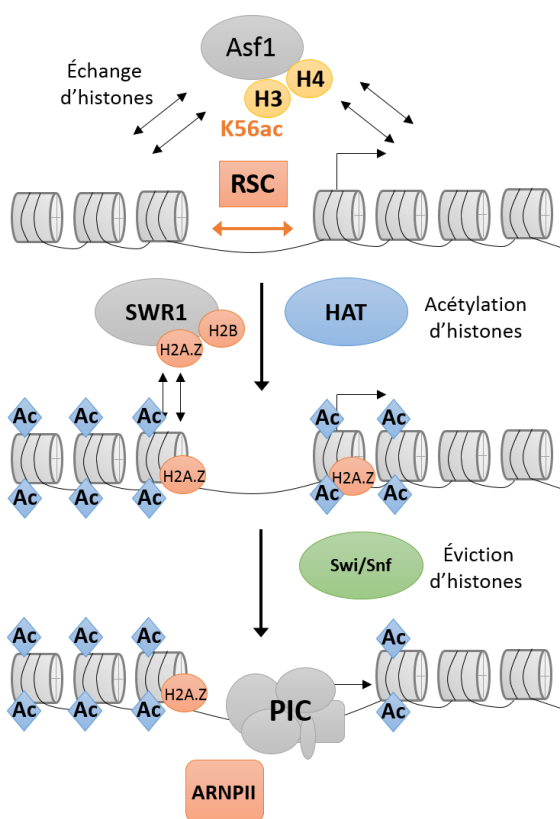


Figure 1.9 : Initiation de la transcription au sein de la chromatine

L'initiation de la transcription nécessite l'action concertée de plusieurs facteurs chromatiniens qui régulent l'accès de la machinerie transcriptionnelle sur l'ADN. La modulation de la chromatine passe par l'échange d'histone, le remodelage ATP-dépendant par les complexes RSC ou Swi/Snf, l'incorporation du variant H2A.Z par SWR1, l'acétylation des histones par des complexes acétyltransférase (HAT) tels que NuA4 ou SAGA. Ensemble, ils organisent les régions promotrices de façon à faciliter l'initiation de la transcription.

S'il n'y a pas d'évidence claire du phénomène de pause de l'ARNPII au niveau du promoteur chez la levure, l'assemblage de PIC incomplets a toutefois été identifié à de nombreux gènes inactifs en phase exponentielle de croissance (Zanton and Pugh, 2006). L'étude approfondie de l'activation du gène de levure *CYCI* (iso-1-cytochrome c) montre que lorsque son expression est très faible et non induite, son promoteur est occupé par la TBP, TFIID, SAGA, Iws1 et l'ARNPII phosphorylée sur la sérine 5 du CTD (Martens et al., 2001; Zhang et al., 2008). Lors de l'ajout d'une source de carbone non-fermentable (éthanol), le complexe SWI/SNF, le chaperon d'histone Spt6 et le complexe Médiateur sont recrutés et autorisent l'élongation transcriptionnelle processive (Lee et al., 2010; Zhang et al., 2008). Le modèle proposé pour expliquer ce phénomène est que la structure

nucléosomale empêche l'élongation transcriptionnelle jusqu'au recrutement de facteurs chromatiniens qui permettent de franchir cette barrière physique et de transcrire efficacement le gène.

Sur le corps des gènes, les nucléosomes représentent également un obstacle à la progression de l'ARNPII en élongation (Bondarenko et al., 2006; Gaykalova et al., 2015). Il a été montré *in vitro* que dans certaines conditions, l'ARNPII peut transcrire au travers d'un seul nucléosome (Lorch et al., 1987) mais une succession de nucléosomes sur un brin d'ADN constitue une entrave (Izban and Luse, 1991). Ainsi, la chromatine doit être déstabilisée de façon concomitante à la transcription pour permettre une élongation processive. Les premières analyses *in vivo* concernant l'ARNPII ont montré que le passage de la polymérase entraîne une perte des dimères H2A-H2B sans pour autant affecter le positionnement des nucléosomes (Kireeva et al., 2002). Il a par la suite été montré que le taux de transcription est inversement corrélé à la densité d'occupation nucléosomale, ce qui soutient la notion de désassemblage des nucléosomes face à la polymérase (Lee et al., 2004). Enfin chez la levure, une étude au niveau de gènes inductibles au galactose a permis de mettre en évidence que la perte des nucléosomes est très rapide suite à l'induction transcriptionnelle et proportionnelle au niveau d'occupation de l'ARNPII (Schwabish and Struhl, 2004). De plus, suite à l'arrêt de la transcription, les nucléosomes sont rapidement reconstitués dans le sillage de la machinerie transcriptionnelle (Schwabish and Struhl, 2004). Ainsi, la transcription par l'ARNPII nécessite un désassemblage partiel ou total des nucléosomes suivi de leur reconstitution rapide (Fig. 1.10). En effet, si le retrait d'un seul dimère H2A-H2B suffit au passage de l'ARNPII, les nucléosomes semblent totalement désassemblés au niveau des gènes fortement transcrits (Belotserkovskaya, 2003; Kireeva et al., 2002). Ces données sont cohérentes avec le fait que l'échange des dimères H2A-H2B est plus élevé que celui des histones H3-H4 dans les régions codantes. Enfin, la progression de la machinerie transcriptionnelle repose sur différents modes de régulation selon le niveau de transcription. Une étude au locus *GAL-10* chez la levure a mis en évidence une perte nette des nucléosomes après une forte induction de la transcription. Comparativement, sur certains gènes constitutifs modérément transcrits, il semble qu'il n'y ait pas de perte de nucléosomes mais qu'ils soient acétylés de façon dépendante de la transcription (Kristjuhan and Svejstrup, 2004)

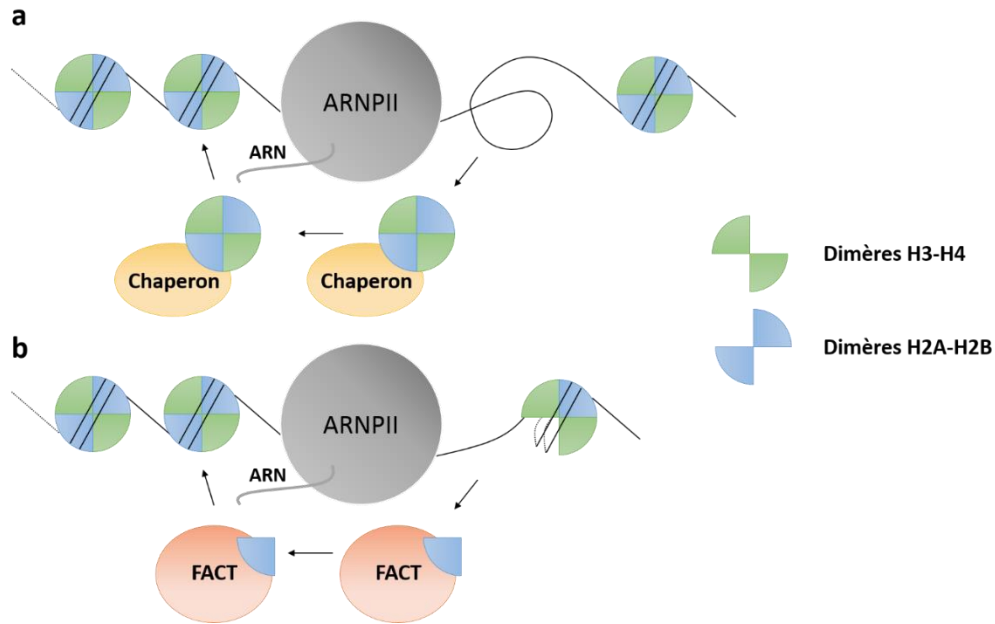


Figure 1.10 : Élongation transcriptionnelle au travers des nucléosomes

Lors de l'élongation par l'ARNPII, son passage au travers des nucléosomes peut donner lieu au déplacement complet de l'octamère d'histone. Les histones seront alors prises en charge par les chaperons d'histones qui favorisent leur recyclage (a). Sur les gènes faiblement ou modérément transcrits, un désassemblage partiel du nucléosome peut suffire à la progression de la machinerie transcriptionnelle. Le complexe chaperon d'histone FACT participe ainsi au déplacement et au recyclage d'un dimère H2A-H2B (b) (inspiré de Selth et al., 2010).

Malgré la nécessité de déstabiliser la chromatine pour transcrire l'ADN, il reste crucial de maintenir la densité nucléosomale et l'état épigénétique des régions codantes lors de ce processus pour éviter l'accumulation de transcrits cryptiques intragéniques. Chez la levure, ce phénomène de transcription aberrante est étendu à plus de 1000 gènes, soit plus de 15% des gènes (Cheung et al., 2008). Mais il est également avéré dans des cellules de mammifères que des défauts de restructuration des nucléosomes lors de l'élongation donne lieu à un état chromatinienn permmissif des régions codantes et à une accumulation de transcrits opportunistes (Xie et al., 2011). Plusieurs mécanismes participent ainsi à la régulation de l'élongation, impliquant de nombreux régulateurs de la chromatine qui seront décrits plus en détail ci-dessous (Selth et al., 2010).

1.4.2. Modifications post-traductionnelles des histones lors de l'élongation transcriptionnelle

Les principales modifications épigénétiques des histones associées à l'élongation transcriptionnelle sont des marques d'acétylation des histones H3 et H4, la méthylation de l'histone H3 sur les lysines 4 et 36 et la mono-ubiquitination de H2B sur la lysine 123 (Fig. 1.11).

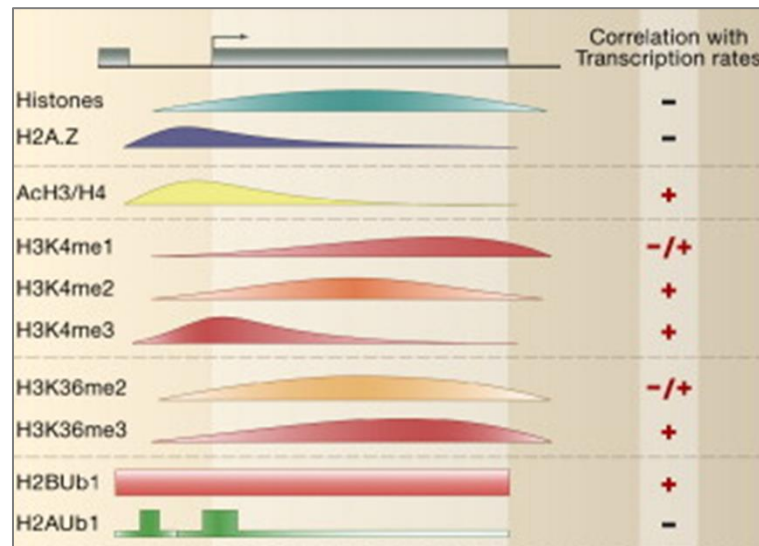


Figure 1.11 : Distribution des marques d'histones sur les régions codantes

Description chez la levure de la répartition des modifications post-traductionnelles des histones au niveau de la région promotrice et dans le corps du gène. Ces marques sont positivement ou négativement corrélées à l'activité transcriptionnelle (modifié de Li et al., 2007).

1.4.2.1. Acétylation

L'acétylation des histones est la modification la plus abondante et la plus étudiée. Elle touche principalement les extrémités N-terminales des quatre histones qui composent le cœur du nucléosome (H2A, H2B, H3 et H4). L'acétylation de la chromatine est associée aux régions du génome activement transcrites et ces marques sont déposées par les HAT (Histone AcétylTransférase). Les HAT ont un rôle bien défini de co-activateurs de l'initiation transcriptionnelle en déstabilisant la chromatine des régions promotrices (Kingston and Narlikar, 1999; Larschan and Winston, 2001; Pokholok et al., 2005;

Workman and Kingston, 1998). En revanche, dans les régions codantes, le rôle de l'acétylation reste mal caractérisé. Contrairement aux régions promotrices nettement enrichies en histones acétylées, les nucléosomes positionnés à l'intérieur des gènes conservent un niveau faible d'acétylation (Kouskouti and Talianidis, 2005). Il est pourtant montré à certains loci que le niveau d'acétylation dans les régions codantes est positivement corrélé avec l'activité transcriptionnelle (Kristjuhan et al., 2002). D'autre part, la transcription de certains gènes constitutivement actifs est affectée dans des mutants de certaines HAT (comme Gcn5 et Elp3). Dans ce cas, les histones H3 sont hypoacétylées à l'intérieur des gènes mais l'acétylation des promoteurs n'est pas altérée, suggérant un rôle fonctionnel de l'acétylation dans l'élongation de la transcription (Kristjuhan et al., 2002).

Plusieurs HAT ont été associées à l'élongation transcriptionnelle. Parmi elles, Gcn5, qui appartient au complexe SAGA, est une HAT ayant un rôle potentiel dans l'élongation. En effet, elle interagit génétiquement avec des facteurs d'élongation comme par exemple *TFIIS* (Wery et al., 2004), et la mutation de *GCN5* conduit à une diminution de l'acétylation des régions codantes associée à des défauts transcriptionnels (Govind et al., 2007; Kristjuhan et al., 2002; Kristjuhan and Svejstrup, 2004). Esa1 (complexe NuA4), est une HAT responsable de l'acétylation de H4 dans les régions transcrites, et qui est requise pour le recrutement de RSC via son bromodomaine, favorisant l'éviction des nucléosomes au cours de l'élongation transcriptionnelle (Ginsburg et al., 2009).

Les HDAC (Histone DéACétylase), qui retirent les marques d'acétylation de la chromatine, sont également enrichies dans les régions codantes (Carrozza et al., 2005; Govind et al., 2010; Keogh et al., 2005; Wang et al., 2002), ceci pouvant expliquer le faible niveau d'acétylation observé. Ces protéines ont généralement une fonction de répresseurs transcriptionnels. L'association du complexe déacétylase Rpd3S aux régions transcrites est essentielle à la suppression de l'initiation cryptique intragénique (Carrozza et al., 2005; Joshi and Struhl, 2005; Keogh et al., 2005). Ainsi, le modèle proposé est qu'une dynamique co-transcriptionnelle d'acétylation-déacétylation des nucléosomes régule l'élongation : l'acétylation des histones permet de faciliter le désassemblage de la chromatine en amont de l'ARNPII. Consécutivement, la déacétylation des régions transcrites referme la chromatine pour maintenir sa structure et prévient ainsi les évènements de transcription

cryptique. Il a récemment été montré que l'espacement des nucléosomes à l'intérieur des gènes affecte la fonction de Rpd3S, octroyant ainsi un rôle aux complexes de remodelage de la chromatine dans la modulation de cette voie de déacétylation (Lee et al., 2013). Pour finir, la méthylation de la lysine 36 de l'histone H3 qui sera décrite ci-dessous, est impliquée dans la signalisation de ce mécanisme crucial au rétablissement de la structure de la chromatine. En effet, si Rpd3S est recruté par l'ARNPII phosphorylée sur les sérines 5 du CTD, son activité est dépendante de H3K36me3 (Drouin et al., 2010; Govind et al., 2010).

1.4.2.2.Méthylation

La méthylation des histones impliquée dans la régulation transcriptionnelle touche principalement les résidus lysines qui peuvent être mono, di ou triméthylés. Ces différents états de méthylations peuvent avoir des fonctions distinctes. Il existe des marques de méthylation enrichies à des régions transcriptionnellement réprimées (H3K9, H3K27 et H4K20), mais également aux gènes activement transcrits (H3K4, H3K79 et H3K36). Les principales marques de méthylation associées à l'élongation transcriptionnelle sont les di ou triméthylations de H3K4 et H3K36 (Kouzarides, 2007).

Le rôle de la méthylation de H3K36 lors de l'élongation est le mieux caractérisé. L'ARNPII en élongation est phosphorylée sur les sérines 2 du CTD par Ctk1 ce qui permet le recrutement de la méthyltransférase Set2. Set2 méthyle H3K36 sur le corps des gènes de façon co-transcriptionnelle (Krogan et al., 2003; Li et al., 2003). Après le passage de la polymérase, la chromatine des régions transcrites est acétylée. H3K36me3 favorise le recrutement et l'activité du complexe déacétylase Rpd3S via les chromodomains de sa sous-unité Eaf3 et le domaine PHD de sa sous-unité Rco1, ce qui permet la déacétylation des histones dans les régions transcrites et la réorganisation de la chromatine dans une conformation fermée, impropre à l'initiation cryptique intragénique (Carrozza et al., 2005; Govind et al., 2010; Joshi and Struhl, 2005; Keogh et al., 2005; B. Li et al., 2007b). Enfin, il a récemment été montré que la méthylation d'H3K36 par Set2 limite la transcription

d'ARN antisens intragéniques issus majoritairement de la région 3' des long gènes, par un mécanisme encore non élucidé (Venkatesh et al., 2016).

La méthylation de lysine 4 de l'histone H3 est également couplée à l'élongation transcriptionnelle. L'enzyme responsable de cette marque est la méthyltransférase Set1 (Miller et al., 2001), qui appartient au complexe COMPASS (COMplex Proteins Associated with Set1). Comme Set2, Set1 est recrutée par le CTD de l'ARNPII mais par les sérines 5 phosphorylées lors des étapes précoces de l'élongation (Ng et al., 2003). Un pic d'enrichissement de H3K4me3 fait immédiatement suite aux promoteurs alors que le pic de H3K4me2 est plus en aval, suggérant un rôle fonctionnel différent (Fig. 1.11, Ng et al., 2003; Pokholok et al., 2005). Chez la levure, il a été montré que H3K4me2 recrute Set3, un complexe HDAC qui déacétyle les histones H3-H4 des régions 5' des gènes transcrits (Kim and Buratowski, 2009). De plus, il semble que la majorité des gènes cibles de Set3 soit également le siège d'une transcription non codante qui affecte le profil épigénétique des régions géniques, et notamment la méthylation d'H3K4 (Lenstra et al., 2011). Il est proposé que Set3 agisse en collaboration avec cette transcription non-codante dans les régions 5' pour moduler l'expression de certains gènes (Kim et al., 2012). De façon intéressante, ce mécanisme permet une régulation très fine de la cinétique d'induction transcriptionnelle suite à un signal extérieur comme le changement de source de carbone, et donc l'adaptation métabolique. Les profils de méthylation de H3K36 et H3K4, bien conservés dans le domaine eucaryote, ont une importance majeure dans le maintien d'un faible niveau d'acétylation de la chromatine des régions codantes en favorisant notamment le recrutement de déacétylases.

1.4.2.3.Ubiquitination

En plus de l'acétylation et de la méthylation des histones, l'ubiquitination est également une modification covalente de la chromatine ayant un rôle régulateur de la transcription. La polyubiquitination des protéines est généralement associée à l'adressage et à la dégradation par le protéasome (Varshavsky, 2005). A l'inverse, l'ubiquitination de la chromatine se

traduit par l'ajout d'une seule ubiquitine ou monoubiquitination, qui est plutôt considéré comme un signal fonctionnel (Pickart, 2001). La monoubiquitination de H2AK119 est plutôt associée à la répression transcriptionnelle (Zhou et al., 2008), alors que H2BK123ub1 (K120 chez les mammifères) semble être une conséquence de l'activation transcriptionnelle à la fois sur les promoteurs et dans les régions codantes.

L'histone H2B est monoubiquitinée par le complexe Rad6/Bre1/Lge1, dont la sous-unité Bre1 est l'E3 ubiquitine ligase (Hwang et al., 2003; Wood et al., 2003). Ce complexe est recruté aux promoteurs et à l'intérieur des gènes transcrits via son association avec le complexe d'élongation PAF et l'ARNPII (Weake and Workman, 2008). H2Bub1 influence la transcription de deux manières distinctes connues. La première est que l'ubiquitination de H2B est un prérequis à la méthylation de l'histone H3 et notamment de H3K4me2/3. En effet, H2Bub1 permet le recrutement de Cps35, sous-unité du complexe COMPASS essentielle à la di- et tri- méthylation d'H3K4. Deuxièmement, H2Bub1 favorise plus directement l'élongation transcriptionnelle en collaborant avec le complexe FACT pour d'une part désassembler les nucléosomes ubiquitinés en amont de l'ARNPII (Pavri et al., 2006) et favoriser ensuite leur réassemblage dans son sillage et supprimer ainsi la transcription cryptique intragénique (Fleming et al., 2008).

1.4.3. Complexes de remodelage ATP-dépendants et élongation transcriptionnelle

Les nucléosomes sont une barrière à l'élongation. De nombreuses études *in vitro* ont mis en évidence que lorsque l'ARNPII se heurte à un nucléosome, elle s'arrête, fait marche arrière, avant de poursuivre l'élongation transcriptionnelle aidée par les facteurs d'élongation comme TFIIS ou FACT pour surmonter l'obstacle (Belotserkovskaya et al., 2003; Bondarenko et al., 2006; Hsieh et al., 2013; Kireeva et al., 2005). Jusqu'à très récemment, une intervention des complexes de remodelage ATP-dépendants lors de l'élongation étaient suspectée sans pour autant être avérée. Un certain nombre d'analyses appuient aujourd'hui fortement leur implication dans ce processus.

Plusieurs études suggèrent que le complexe RSC favorise l'élongation transcriptionnelle en plus de l'initiation. En effet, il a d'abord été montré *in vitro* que RSC favorise le passage de l'ARNPII au travers d'un mononucléosome en collaboration avec l'acétylation des histones par les complexes SAGA et NuA4 (Carey et al., 2006). D'autre part, RSC est recruté aux gènes induits lors d'un stress osmotique pour faciliter leur transcription (Mas et al., 2009). Le complexe RSC interagit physiquement avec l'ARNPII (Soutourina et al., 2006) ; une étude récente a montré que la sérine 2 phosphorylée du CTD promeut le recrutement de RSC aux gènes faiblement exprimés afin de favoriser leur transcription et la redéposition subséquente des nucléosomes (Spain et al., 2014).

Le complexe SWI/SNF, qui appartient à la même famille, interagit quant à lui génétiquement avec *TFIIS* (Davie and Kane, 2000) et *SPT6* (Neigeborn et al., 1986) impliqués dans l'élongation transcriptionnelle. De plus, un mutant *swi2* présente une sensibilité aux drogues qui affectent l'élongation transcriptionnelle (6-Azauracile et acide mycophénolique) et supprime le phénotype d'initiation cryptique intragénique de mutants *spt16* (complexe FACT), suggérant un rôle positif dans l'éviction des nucléosomes lors de l'élongation (Schwabish and Struhl, 2007). Enfin, SWI/SNF est également retrouvé associé aux régions codantes des gènes transcrits (Schwabish and Struhl, 2007).

Enfin Chd1 (seul représentant de la famille CHD chez la levure), est physiquement lié à l'ARNPII en élongation au travers d'interactions avec les complexes PAF, FACT et Spt4-Spt5 (Krogan et al., 2002; Simic et al., 2003). De plus, Chd1 est essentiel au maintien d'un niveau élevé d'ubiquitination de H2B dans les régions codantes (Lee et al., 2012), elle-même impliquée dans la déstabilisation des nucléosomes par FACT lors de l'élongation (Pavri et al., 2006). Chez les mammifères, il a été montré que Chd1 est enrichi aux NFR des gènes transcrits de façon dépendante de H3K4me3, via ses chromodomains (Lin et al., 2011). De plus, une étude récente chez la souris a mis en évidence qu'il participe à l'éviction des nucléosomes en 5' des gènes, favorisant ainsi la sortie de pause de l'ARNPII (Skene et al., 2014). De façon comparable, chez la levure et la drosophile, Chd1 favorise l'échange d'histones en 5'; en revanche, il favorise leur conservation en 3' sur les longs gènes (Radman-Livaja et al., 2012). Chez la levure, si Chd1 est enrichi aux NFR des promoteurs, son action est majoritairement décrite dans le corps des gènes (Zentner et al.,

2013). En effet, Chd1 et ISW1 repositionnent les nucléosomes à partir du nucléosome +1, de façon à ce qu'ils soient correctement espacés dans les régions codantes (Gkikopoulos et al., 2011; Pointner et al., 2012). De plus, Chd1 et ISW1 collaborent pour restructurer la chromatine des régions transcrites après le passage de l'ARNPII et inhiber la transcription cryptique en limitant notamment l'échange d'histones lors de l'élongation (Cheung et al., 2008; Radman-Livaja et al., 2012; Smolle et al., 2012).

1.4.4. Chaperons d'histones impliqués dans l'élongation transcriptionnelle

1.4.4.1. Le complexe Spt6-Iws1

1.4.4.1.1. Identification des protéines Spt6 et Iws1

Spt6 est un chaperon d'histone essentiel, mis en évidence chez *S. cerevisiae* en 1984 dans un criblage génétique visant à identifier des mutants qui suppriment l'effet de l'insertion d'éléments transposables dans la région 5' de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés. L'insertion d'un élément transposable δ dans la région promotrice du gène *HIS4* altère la transcription du gène, or la mutation ou la surexpression de *SPT6* permettent de rétablir l'expression de *HIS4*, on parle de phénotype *spt-* (Clark-Adams and Winston, 1987; Winston et al., 1984). De nombreux gènes *SPT* (SuPpressor of Ty) impliqués dans la régulation de la transcription ont été identifiés dans cette étude (tableau 1.3). *SPT6* a également été identifié dans 2 autres criblages génétiques. Dans une première étude, la mutation de *SPT6* (*CRE2*) restaure l'expression de *ADH2* malgré l'absence de son facteur de transcription Adr1 (Denis, 1984). Dans la seconde, les mutations de *SPT6* (*SSN20*) suppriment l'effet de la perte du facteur de remodelage chromatinien ATP-dépendant SWI/SNF, nécessaire à l'activation du gène codant pour l'invertase *SUC2* en réponse à la privation en glucose (Neugeborn et al., 1987). Il s'agit de la toute première indication selon laquelle Spt6 a la capacité de modifier la structure chromatinienne.

La protéine Iws1 (Interact With Spt6), également connue sous le nom de Spn1 (suppression post-recrutement fonction gène number 1), a été identifiée dans un criblage génétique visant à identifier des mutants qui suppriment les défauts d'initiation transcriptionnelle d'un allèle muté de la TBP (Fischbeck et al., 2002). Dans cette étude, la TBP est recrutée au gène *CYC1* mais ne permet pas d'activer la transcription lors d'une induction par ajout d'éthanol et le mutant *spn1* K192N supprime ce phénotype. Iws1 est une protéine nucléaire très conservée, essentielle chez *S. cerevisiae*, et qui appartient à la famille des gènes *SPT* (sa mutation supprime l'effet d'insertion d'un élément δ dans les régions 5' des gènes *HIS4* ou *LYS2* (Fischbeck et al., 2002). D'autre part, elle interagit génétiquement (léthalité synthétique) avec les facteurs d'élongation Spt6, Spt4 et Spt5 (Lindstrom et al., 2003).

Nom	Alias	Gène Essentiel	Fonction
<i>SPT1</i>	<i>HIR2</i>		Sous-unité du complexe HIR
<i>SPT2</i>	<i>SINI-EXA1</i>		Facteur d'élongation
<i>SPT3</i>			Sous-unité du complexe SAGA
<i>SPT4</i>			Sous-unité du complexe DSIF
<i>SPT5</i>		Oui	Sous-unité du complexe DSIF
<i>SPT6</i>	<i>SSN20-CRE2</i>	Oui	Chaperon d'histone, facteur d'élongation
<i>SPT7</i>	<i>GIT2</i>		Sous-unité du complexe SAGA
<i>SPT8</i>			Sous-unité du complexe SAGA
<i>SPT10</i>	<i>CRE1-SUD1</i>		Acétylase de l'histone H3
<i>SPT11</i>	<i>HTA1</i>		Histone H2A
<i>SPT12</i>	<i>HTB1</i>		Histone H2B
<i>SPT13</i>	<i>MED15-GAL11</i>		Sous-unité du complexe Mediateur
<i>SPT14</i>		Oui	
<i>SPT15</i>	<i>TBP</i>	Oui	Tata-Binding Protein
<i>SPT16</i>	<i>SSF1-CDC68</i>	Oui	Sous-unité du complexe chaperon d'histone FACT
<i>SPT20</i>	<i>ADA5</i>		Sous-unité du complexe SAGA
<i>SPT21</i>			

Tableau 1.3 : Gènes codants pour les protéines de la famille SPT et leur fonction
(adapté de Yamaguchi et al., 2001)

1.4.4.1.2. Le complexe Spt6-Iws1 : caractérisation et importance biologique

Des analyses protéomiques chez la levure ont permis l'identification du complexe Spt6-Iws1 en démontrant que Iws1 co-précipite de manière constante avec Spt6 (Gavin et al., 2002; Krogan et al., 2002). L'interaction a été confirmée chez les mammifères, où la

formation du complexe Spt6-Iws1 ne s'effectuerait que lorsque Spt6 est lié au CTD de l'ARNPII en phase d'élongation (Yoh et al., 2008, 2007). D'un point de vue structural, Spt6 est constitué de 3 domaines distincts (Fig. 1.12) : une région N-terminale non structurée riche en résidus acides (acides aminés 1-298); une région centrale homologue au facteur de transcription procaryote Tex (acides aminés 299-1250); et une portion C-terminale (acides aminés 1251-1451) contenant 2 domaines SH2 (Src Homology 2) longtemps considérés comme capables de lier l'ARNPII via la sérine 2 phosphorylée du CTD (Close et al., 2011; Diebold et al., 2010; Johnson et al., 2008; Yoh et al., 2007). Toutefois une étude récente montre que les domaines SH2 de Spt6 de levure lieraient plutôt la région flexible « linker » de la sous-unité Rpb1, à l'interface entre sa partie enzymatique et son CTD, plutôt que les sérine 2 phosphorylés du CTD (Sdano et al., 2017). La structure de l'interaction Spt6-Iws1 a été résolue par cristallographie (McDonald et al., 2010). Il est mis en évidence que Spt6 interagit avec Iws1 via sa partie N-terminale et plus précisément les résidus 239-268, et que Iws1 interagit via son domaine central (acides aminés 148-293), qui est également le domaine protéique minimum, nécessaire et suffisant à la survie cellulaire (Pujari et al., 2010). Enfin, l'interface de contact entre Spt6 et Iws1 révèle de multiples interactions hydrophobes et polaires. L'altération de l'interaction par mutation des résidus impliqués induit des défauts de croissance et d'organisation de la chromatine alors que l'abolition complète de la formation du complexe est létale (McDonald et al., 2010). Ces données ont mis en lumière la nature essentielle du complexe Spt6-Iws1, et son implication dans le maintien de la structure de la chromatine lors du processus transcriptionnel.

1.4.4.1.3. Chaperon d'histone et organisation de la chromatine

Il est très tôt évoqué que Spt6 est capable de reconstituer des nucléosomes dans les régions transcrites (Neigeborn et al., 1987), suggérant un rôle de chaperon d'histone. En 1996, Bortvin et Winston ont montré que le phénotype d'hypersensibilité à la digestion par la nucléase micrococcale (MNase) dans des souches dont la fonction de SWI/SNF est altérée est supprimé par la mutation de *SPT6* ou la délétion de *HTA1-HTB1*. D'autre part, dans

cette étude, il est également montré que Spt6 interagit directement avec les histones *in vitro* et possède la capacité d'assembler des nucléosomes *in vitro* sur un ADN plasmidique, démontrant ainsi sa fonction intrinsèque de chaperon d'histone.

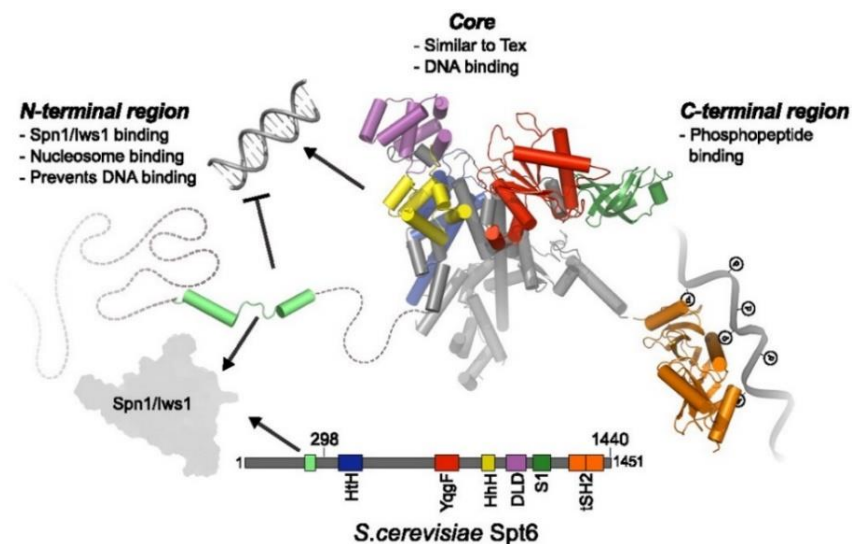


Figure 1.12 : Représentation des 3 domaines structuraux de Spt6 et des fonctions associées

La région N-terminale de Spt6 est non-structurée. Elle contient la région d'interaction avec lws1 et les nucléosomes (vert clair), et elle inhibe l'interaction spécifique de Spt6 avec l'ADN. Le domaine central de Spt6 est constitué de plusieurs domaines fonctionnel : HtH (Helix-Turn-Helix), YqgF (RNase H-like domain), HhH (Helix-Hairpin-Helix), DLD (Death-Like Domain), et S1. Le domaine central isolé a la capacité de lier l'ADN. La région C-terminale contient 2 domaines SH2 en tandem via lesquels Spt6 interagit avec le CTD de l'ARNPII au niveau des sérines 2 phosphorylées (Adapté de Close et al., 2011).

Une étude ultérieure a montré que la mutation de Spt6 conduit à l'apparition de transcrits courts sur certains gènes comme *FLO8* ou *STE11* (Kaplan et al., 2003). Ces transcrits cryptiques résultent d'une initiation transcriptionnelle intragénique anormale. L'analyse de l'ensemble des transcrits de *S. cerevisiae* a mis en évidence que Spt6 est impliqué dans l'inhibition d'évènements de transcription cryptique intragénique dans près d'un gène sur cinq (Cheung et al., 2008). De façon générale, il a depuis été montré que l'altération de la fonction de Spt6 induit une diminution de l'occupation des nucléosomes sur l'ADN dans les régions transcrites, conduisant à la dérégulation d'évènements de transcription cryptique (DeGennaro et al., 2013; Ivanovska et al., 2011; Kato et al., 2013; Thebault et al., 2011). Ainsi, une des fonctions premières de Spt6 est de reconstituer les nucléosomes dans le sillage de l'ARNPII. Cette reconstitution s'accompagne d'une conservation co-

transcriptionnelle des histones dans les régions codantes démontrée à certains loci, au détriment de l'échange d'histones, afin de maintenir l'état épigénétique (Ferrari and Strubin, 2015; Kato et al., 2013). En effet, une étude chez *S.Pombe* confirme la perte de nucléosomes dans les régions transcrites en absence de Spt6, et montre une compensation partielle par l'augmentation du niveau d'H3K56ac dans la fraction insoluble traduisant l'incorporation dans la chromatine d'histones H3 nouvellement synthétisées (Kato et al., 2013). Le niveau d'H3K4me2/3 est également affecté, conduisant à une modification drastique de l'épigénome (Kato et al., 2013). De plus, le lien entre un défaut de reconstitution des nucléosomes en absence de Spt6, et une forte dérépression de la transcription cryptique intragénique et antisens a été clairement confirmée par des analyses génomiques de séquençage à haut débit des ARN totaux chez *S.cerevisiae* et *S.pombe* (DeGennaro et al., 2013; Uwimana et al., 2017). Cette étude associe également la perte de fonction de Spt6 à un défaut global de positionnement des nucléosomes dans les régions codantes en plus d'une modification de leur état épigénétique. Ainsi, le modèle d'action de Spt6 est qu'il participe à l'organisation de la chromatine dans le sillage de l'ARNPII en limitant l'échange d'histones, et en favorisant le positionnement précis des nucléosomes dans les régions transcrites. En plus de sa fonction de recyclage, il est également montré que Spt6 atténue l'incorporation d'histones portant certaines modifications à l'intérieur des gènes. En collaboration avec le complexe FACT, Spt6 permet de limiter l'incorporation du variant H2A.Z (localisé préférentiellement au promoteur) dans les régions codantes, supprimant par ce biais les événements d'initiations cryptiques intragéniques (Jeronimo et al., 2015). Structuellement, Spt6 engage le même domaine protéique dans sa liaison avec les nucléosomes et avec son partenaire Iws1 (McDonald et al., 2010). La formation du complexe pourrait ainsi jouer un rôle de régulateur de la fonction chaperon d'histone de Spt6 par compétition vis-à-vis de l'interaction avec les nucléosomes.

1.4.4.1.4.Rôle de Spt6-Iws1 dans l'élongation transcriptionnelle

Du fait de sa capacité à affecter la structure de la chromatine, il apparait clairement que le complexe Spt6-Iws1 est un acteur important du processus de transcription. Cependant,

plusieurs données soutiennent qu'il pourrait également réguler directement la machinerie transcriptionnelle.

Tout d'abord chez la levure, *SPT6* interagit génétiquement avec le facteur d'élongation *TFIIS* (Hartzog et al., 1998). D'autre part, des souches exprimant Spt6 ou Iws1 mutées sont sensibles au 6Azauracile, indiquant un défaut d'élongation transcriptionnelle lorsque la fonction de Spt6-Iws1 est affectée (Fischbeck et al., 2002; Hartzog et al., 1998). Il est également montré que Sp6, seul ou en association avec le facteur d'élongation DSIF (Spt4-Spt5 chez *S.cerevisiae*) est capable de stimuler l'élongation *in vitro* sur de l'ADN nu, dépourvu de nucléosomes (Endoh et al., 2004). *In vivo*, le ``knock down`` de *SPT6* par siARN, réduit également le taux de transcription de l'ARNPII en élongation (Ardehali et al., 2009). Le recrutement séquentiel de la machinerie transcriptionnelle a été étudié en 2010 chez la drosophile au gène *HSP70* après une induction par choc thermique (Zobeck et al., 2010). Cette étude montre que Spt6 est recruté quelques secondes après la polymérase et le facteur PTEF-b, responsable de la phosphorylation de la sérine 2 du CTD de l'ARNPII. Ainsi ces données soutiennent un rôle plus spécifique de Spt6 durant la phase d'élongation. Enfin, Spt6 est localisé aux régions activement transcrites et interagit spécifiquement avec l'ARNPII en élongation (Andrulis et al., 2000; Ivanovska et al., 2011; Yoh et al., 2007). Récemment, une implication directe de Spt6 a été proposée dans la voie de régulation de la phosphorylation des sérines 2, montrant une dépendance mutuelle entre les fonctions de Spt6 et Ctk1, qui repose notamment sur le complexe PAF (Dronamraju and Strahl, 2014). De plus Ctk1 et Bur1, qui collaborent pour phosphoryler le CTD, permettent le recrutement de Spt6 via les sérines 2 phosphorylées principalement en 5' des gènes. Son recrutement en 3' semble en revanche dépendant de la phosphorylation de la tyrosine 1, et pourrait être ainsi préférentiellement impliqué dans la coordination des mécanismes de terminaison transcriptionnelle (Burugula et al., 2014).

Le rôle d'Iws1 seul dans l'élongation reste mal connu à ce jour mais le complexe Spt6-Iws1 régule la triméthylation co-transcriptionnelle de H3K36 chez les eucaryotes supérieurs (Fig. 1.13 ; Yoh et al., 2008, 2007). Le modèle proposé consiste en un recrutement de Spt6 via son domaine SH2, au niveau du CTD phosphorylé sur la sérine 2 de l'ARNPII. S'en suit le recrutement d'Iws1 qui recrute à son tour la méthyltransférase Setd2. En effet, un lien fort est démontré entre Spt6 et Set2. Chez la levure, l'allèle mutant *spt6-1004* présente une perte

totale de H3K36me_{2/3} (Chu et al., 2006). De plus, la triméthylation de H3K36 par Set2 réduit considérablement l'affinité *in vitro* de Spt6 pour l'histone H3, contrairement à sa diméthylation qui est enrichi au cours de l'élongation (Venkatesh et al., 2012). Le complexe Spt6-Iws1 régule donc le dépôt de la marque épigénétique H3K36me₃ au cours de l'élongation, permettant ainsi le recrutement de facteurs de remodelage chromatiniens impliqués dans la restauration de la structure de la chromatine suite au passage de la machinerie transcriptionnelle. Dans ce contexte, affecter la fonction d'Iws1 induit une diminution du niveau d'H3K36me₃ (Yoh et al., 2008). Pour finir, le recrutement du complexe Spt6-Iws1 via le CTD phosphorylé de l'ARNPII autorise son implication dans des mécanismes de surveillance, de maturation et d'export au cytosol des ARN messagers (Fig. 1.13, Andrulis et al., 2000; Yoh et al., 2007).

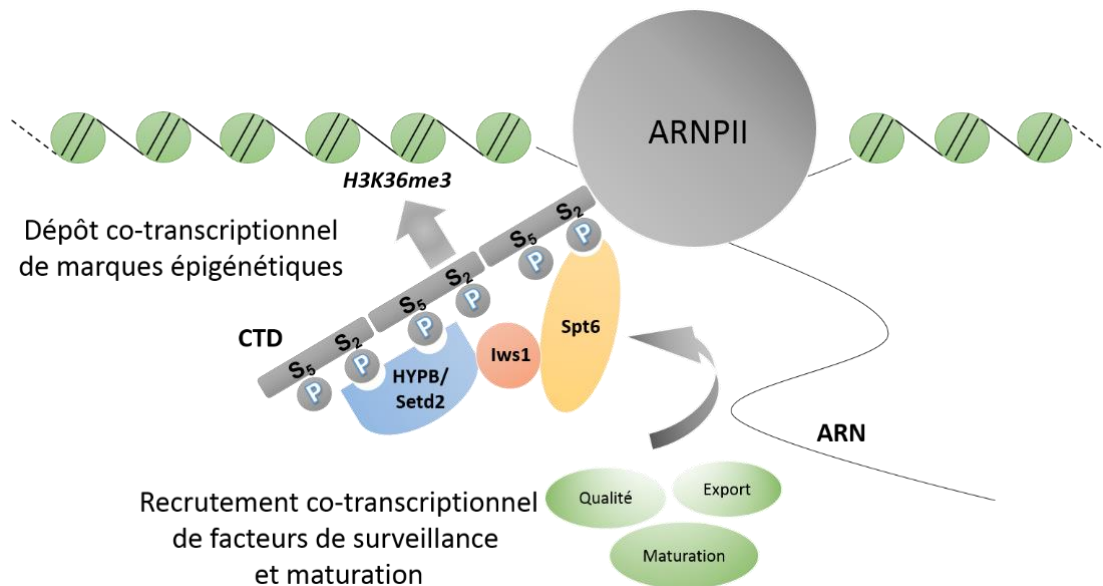


Figure 1.13 : Implication du complexe Spt6-Iws1 dans les mécanismes co-transcriptionnels

Spt6 interagit directement avec les sérines 2 phosphorylées de l'ARNPII en phase d'élongation, permettant ainsi le recrutement de Iws1. Le complexe Spt6-Iws1 recrute d'une part la méthyltransférase Setd2 et participe ainsi au dépôt de la marque H3K36me₃; et d'autre part, des facteurs impliqués dans le contrôle qualité, la maturation et l'export des ARNm.

Si ce modèle est bien établi dans les cellules mammifères, il a toutefois été montré que chez la levure, Iws1 peut être recruté à la chromatine de façon indépendante de Spt6 (Fischbeck

et al., 2002) et que le complexe ne se forme pas nécessairement via le recrutement au CTD de l'ARNPII. D'autre part, des analyses de ChIP-seq ont montré que si le recrutement du complexe Spt6-Iws1 sur l'ensemble du génome est largement superposable à celui de l'ARNPII phosphorylée sur la sérine 2 (environ 50pb après le TSS), le profil de recrutement de chacun des facteurs Spt6 et Iws1 dans le corps des gènes est toutefois sensiblement différent, suggérant des rôles biologiques en partie distincts et encore mal définis pour ces deux acteurs (Mayer et al., 2010).

1.4.4.2. Le complexe FACT

Tout comme Spt6-Iws1, FACT (FACilitate Chromatin Transcription) est un des acteurs majeurs de la régulation de la structure chromatinienne lors de l'élongation transcriptionnelle. Mais alors que la fonction de Spt6-Iws1 est spécifique à la transcription, FACT est quant à lui également impliqué dans des mécanismes de réplication et de réparation de l'ADN (Formosa, 2012).

FACT est un complexe constitué de deux sous-unités hautement conservées au cours de l'évolution: Spt16 et Pob3 (SSRP1 chez les mammifères). Spt16 est un gène essentiel chez la levure et appartient à la famille des gènes *SPT* (Winston et al., 1984). Chez les mammifères, la partie N-terminale de SSRP1 contient un domaine HMG (High-Mobility Group) qui n'existe pas dans la protéine Pob3. Ce domaine fonctionnel est remplacé chez la levure par la petite protéine HMG Nhp6 qui interagit avec le complexe FACT (Brewster et al., 2001). Si FACT est principalement décrit comme un chaperon d'histone H2A/H2B (Orphanides et al., 1999, 1998), il possède également la capacité d'interagir avec H3/H4 *in vitro* (Belotserkovskaya et al., 2003). D'un point de vue fonctionnel, le complexe a été impliqué dans l'initiation transcriptionnelle, notamment en participant au désassemblage des nucléosomes au niveau des régions promotrices (Biswas et al., 2005; Shimojima et al., 2003). Sa fonction intrinsèque de chaperon d'histone a été mise en évidence *in vitro* par sa capacité à assembler des nucléosomes sur de l'ADN (Belotserkovskaya et al., 2003). Cette capacité lui permet d'assurer le maintien de la structure de la chromatine au cours de

l'élongation. En effet, de la même façon que Spt6, les allèles mutants de Spt16 présentent une accumulation de transcrits cryptiques intragéniques chez la levure (Kaplan et al., 2003). La capacité de FACT à déstabiliser les dimères H2A-H2B dans le nucléosome en amont du passage de l'ARNPII favorise le processus d'élongation (Belotserkovskaya et al., 2003). Des études *in vitro* récentes du mécanisme d'action de FACT ont mis en lumière sa capacité à déstabiliser le nucléosome en amont de l'ARNPII en ciblant l'interface entre l'ADN et un dimère H2A-H2B (Hsieh et al., 2013; Valieva et al., 2016). De plus, il est montré que FACT limite le niveau d'histones libres suite à la transcription et favorise la conservation des dimères H2A-H2B dans les nucléosomes lors de l'élongation *in vitro* (Hsieh et al., 2013). Cette caractéristique est cohérente avec les observations *in vivo* indiquant que FACT reconstitue les nucléosomes dans le sillage de l'ARNPII pour maintenir l'état chromatinien et limiter la transcription cryptique intragénique (Cheung et al., 2008; Formosa, 2012; Kaplan et al., 2003). Son rôle dans l'élongation nécessite une coopération synergique avec la marque épigénétique H2BK123ub1 et le complexe d'élongation PAF (Pavri et al., 2006); il a également été montré que FACT collabore avec le chaperon d'histone Spt6 pour maintenir la structure de la chromatine au cours de l'élongation, tant sur le plan de la reconstitution des nucléosomes que sur leur état épigénétique (Jeronimo et al., 2015; McCullough et al., 2015). Ces données soulignent la complémentarité et l'interdépendance des systèmes qui régulent l'organisation chromatinienne.

1.4.4.3. Le facteur Spt2

Un autre facteur impliqué dans l'élongation de la transcription est *SPT2/SINI*. C'est une protéine à domaine HMG également identifiée chez la levure et qui appartient à la famille des gènes *SPT* (Winston et al., 1984). Son nom *SINI* (Swi Independent 1) provient du fait que sa mutation restaure l'expression du gène rapporteur *HO-lacZ* dans un mutant du complexe de remodelage chromatinien SWI/SNF, qui favorise quant à lui l'initiation transcriptionnelle (Pollard and Peterson, 1997). La mutation de *SPT2/SINI* supprime également les défauts d'initiation transcriptionnelle dus à des mutations du complexe

SAGA. En effet, la transcription du gène *HO* est affectée par la délétion de la sous-unité HAT de SAGA, *GCN5*, et restaurée dans le double mutant *gcn5/sin1* (Pérez-Martín and Johnson, 1998). Enfin, la mutation de *SPT2/SIN1* restaure les phénotypes de délétions partielles du CTD de l'ARNPII (Peterson et al., 1991). Dans cette étude, il est proposé que Spt2 régule négativement l'initiation transcriptionnelle des gènes *INO1* et *HO* en se liant à leurs UAS et pourrait stabiliser les nucléosomes à ces loci, inhibant ainsi la liaison de facteurs d'activation. L'ensemble de ces données indiquent que Spt2 joue un rôle de régulateur négatif dans l'initiation de la transcription.

En 2006, Nourani et al., identifient une interaction fonctionnelle entre Spt2 et les complexes PAF et HIR, impliqués dans l'élongation. Ils montrent que Spt2 est recruté dans les régions codantes activement transcrites de façon dépendante de Spt6 et régule le niveau d'H3 dans ces régions. De plus, comme Spt6 et Spt16, Spt2 supprime l'initiation cryptique intragénique. Ainsi, un rôle de Spt2 dans la sauvegarde de la chromatine au cours de l'élongation est clairement démontré. Les travaux de l'équipe ont mis en évidence que Spt2 intervient dans le maintien d'une structure répressive de la chromatine du locus *SRG1-SER3*, au niveau du promoteur *SER3*, interférant ainsi avec sa transcription (Thebault et al., 2011). Dans ce cas, la région non-codante *SRG1* est transcrite, et Spt2 participe au réassemblage des nucléosomes dans le sillage de l'ARNPII, ce qui régule négativement l'initiation au niveau du promoteur de *SER3*. On parle d'un mécanisme d'interférence par transcription. L'ensemble de ces données indique une similarité fonctionnelle entre les rôles de Spt6, Spt16-Pob3 et Spt2, mais ce n'est que très récemment que le rôle de chaperon d'histone de Spt2 a été démontré (Osakabe et al., 2013). La résolution par cristallographie de l'interaction de la forme humaine de Spt2 avec les histones a montré que Spt2 lie physiquement les tétramères (H3-H4)₂ (Chen et al., 2015). Cette dernière étude a été complétée par des analyses fonctionnelles produites par l'équipe et qui ont montré que Spt2 participe au recyclage des histones (H3-H4)₂ dans le sillage de l'ARNPII et supprime ainsi la transcription cryptique intragénique (Chen et al., 2015). Enfin, les travaux du laboratoire ont mis en évidence que la fonction de Spt2 est régulée par sa phosphorylation par la Caséine Kinase 2 (Bhat et al., 2013). Dans cette étude, Bhat et al., montrent que CK2 régule négativement la fonction de Spt2 dans la suppression de la transcription cryptique chez la levure en affectant la formation de l'interaction entre les chaperons d'histones Spt2 et Spt6.

La phosphorylation des protéines est une voie majeure de la régulation de leur fonction et est impliquée dans la régulation de la totalité des processus cellulaires. Ainsi de nombreux facteurs régulateurs de la chromatine voient leurs fonctions modulées par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation. La contribution de CK2 à ces mécanismes est conséquente et détaillée dans le chapitre ci-dessous.

1.5.La Caséine Kinase 2

La Caséine Kinase 2 (CK2) est une des premières protéines à activité kinase identifiée (Burnett and Kennedy, 1954), elle est hautement conservée chez les eucaryotes et distribuée de manière ubiquitaire. Elle possède un grand nombre de substrats, et a été de ce fait impliquée dans un large éventail de processus cellulaires (Meggio and Pinna, 2003).

1.5.1.Propriétés

CK2 est une sérine/thréonine kinase mais elle a également la capacité de phosphoryler des résidus tyrosines chez la levure et les eucaryotes supérieurs (Bhat et al., 2013; Vilks et al., 2008). Ses protéines cibles sont phosphorylées dans des régions riches en acides aminés chargés négativement avec une séquence de phosphorylation consensus minimale Ser/Thr-x-x-Glu/Asp où un résidu de type Glutamate (Glu) ou Aspartate (Asp) est toujours positionné en n+3 (Meggio and Pinna, 2003). CK2 est une enzyme tétramérique, constituée de 2 sous-unités catalytiques appelées α et α' , et de 2 sous-unités régulatrices β et β' respectivement codées par les gènes *CKA1*, *CKA2*, *CKB1* et *CKB2* chez *S. cerevisiae* (Padmanabha et al., 1990). Bien qu'ayant été découverte il y a plus de 60 ans, les mécanismes qui gouvernent son activité sont encore mal compris. CK2 est décrite comme une protéine kinase constitutivement active et indépendante de seconds messagers. Cependant des modulations de l'assemblage des sous-unités qui la composent et sa localisation intracellulaire contribuent à la régulation de son activité (Duncan and Litchfield, 2008). D'autre part, une signalisation induite par des stimuli extérieurs et ses

interactions avec diverses partenaires protéiques peuvent également réguler sa fonction (Gyenis and Litchfield, 2008; Olsten and Litchfield, 2004).

Des études chez la souris ont montré que CK2 est essentielle au développement embryonnaire précoce (Buchou et al., 2003; Lou et al., 2008). Chez la levure, la perte de fonction de CK2 par délétion de ses 2 sous-unités catalytiques est létale, alors que la perte d'une seule sous unité catalytique n'altère pas la croissance cellulaire (Padmanabha et al., 1990), traduisant une redondance fonctionnelle des sous unités α et α' . Enfin, la nature essentielle, ubiquitaire et pléiotropique de CK2 retentit sur son implication, étendue à diverses pathologies humaines (Duncan and Litchfield, 2008). Une élévation du niveau d'expression de CK2 a été mise en évidence dans de nombreux cancers et son implication dans le processus de cancérogénèse a été identifiée à différents niveaux. En effet, il a été démontré que CK2 favorise la survie et la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et l'invasion et a un rôle anti-apoptotique (Trembley et al., 2009). Des études chez la souris ont également montré que la surexpression de CK2 agirait en synergie avec une dérégulation d'oncogènes (Landesman-Bollag et al., 2001) ou de suppresseurs de tumeur (Landesman-Bollag et al., 1998) pour favoriser la progression tumorale.

1.5.2.Implications de CK2 dans la régulation de la chromatine

De façon générale, CK2 a un rôle de régulateur des processus transcriptionnels en ciblant un grand nombre de facteurs de transcription (Meggio and Pinna, 2003) ainsi qu'en régulant directement l'activité des ARN polymérase I, II et III (Johnston et al., 2002; Palancade et al., 2002; Saez-Vasquez et al., 2001; Sawa et al., 2004). Une étude à large échelle du transcriptome de mutant de CK2 chez la levure indique que la kinase semble avoir un rôle plus spécifique de régulateur global des facteurs de remodelage de la chromatine associés à la transcription (Barz, 2003). Dans ce contexte, une étude suggère fortement que CK2 régule la dynamique chromatinienne d'une manière essentielle à la prolifération intra-érythrocytaire de *P-falciparum*, parasite responsable du paludisme (Dastidar et al., 2012). Plusieurs études font également état d'un détournement des

propriétés de CK2 par des virus lors de l'infection pour favoriser la transcription des gènes viraux (St-Denis and Litchfield, 2009). Aussi, un nombre croissant d'analyses relie directement CK2 à des défauts de régulation épigénétique conduisant au cancer (Deplus et al., 2014; Wu et al., 2013). Les données de l'interactome de CK2 chez *S. cerevisiae* soutiennent que son rôle est prépondérant dans la maintenance de la chromatine associée à la régulation transcriptionnelle (Gavin et al., 2002; Gyenis and Litchfield, 2008). La phosphorylation par CK2 régule la fonction des complexes de remodelage de la chromatine Mi-2 chez la drosophile (Bouazoune and Brehm, 2005), ainsi que la liaison à l'ADN de Ssrp1 (sous-unité du complexe FACT) chez les mammifères (Li et al., 2005). De plus, CK2 contrôle l'import nucléaire et la fonction du chaperon d'histone Nap1 (Calvert et al., 2008). Enfin, il a récemment été montré que la phosphorylation par CK2 de l'histone H2A influence la monoubiquitination de H2B (Basnet et al., 2014). Parallèlement, une autre étude a mis en évidence que CK2 coopère avec FACT pour phosphoryler le complexe PAF, ce qui pourrait également avoir une incidence sur le dépôt de la marque H2Bub1 (Bedard et al., 2016). CK2 jouerait ainsi un rôle dans le remodelage de la chromatine au cours de l'élongation.

Des analyses protéomiques ont montré que CK2 interagit et pourrait phosphoryler certains facteurs chromatiniens essentiels à l'élongation transcriptionnelle : Spt6-Iws1, Spt2, Spt4-Spt5, Spt16 ou Chd1 (Krogan et al., 2002). Dans ce contexte, le laboratoire a montré que la phosphorylation de Spt2 par CK2 module sa fonction et participe ainsi à la reconstitution de la chromatine suite à l'élongation (Bhat et al., 2013). Cette étude a plus précisément montré que Spt2 interagit directement avec le chaperon d'histones Spt6, ce qui permet son recrutement aux régions transcrites. La phosphorylation par CK2 de la portion C-terminale de Spt2 inhibe l'interaction Spt2-Spt6 et régule ainsi négativement le recrutement de Spt2 à la chromatine. En effet, dans un mutant thermosensible dans lequel la fonction de CK2 est abolie (*ck2^{ts}*), le recrutement de Spt2 aux régions transcrites est augmenté. Par opposition, ce recrutement est perdu dans un mutant phosphomimétique de Spt2 (qui mime la phosphorylation constitutive par CK2), qui présente de plus un phénotype de transcription cryptique intragénique au gène *FLO8*. Ainsi la modification post-traductionnelle du chaperon d'histone Spt2 permet de moduler sa fonction. Le modèle proposé est que lors du désassemblage de la chromatine lié à l'élongation par l'ARNPII, Spt2 (via son domaine

HMG) favoriserait la liaison de Spt6 aux nucléosomes pour faciliter leur reconstitution dans le sillage de la machinerie transcriptionnelle. La phosphorylation par CK2 pourrait ensuite affaiblir l'interaction Spt2-Spt6 dans le but de déstabiliser l'interaction entre Spt6 et les nucléosomes et contribuerait ainsi à la régulation du mécanisme de recyclage co-transcriptionnel des histones.

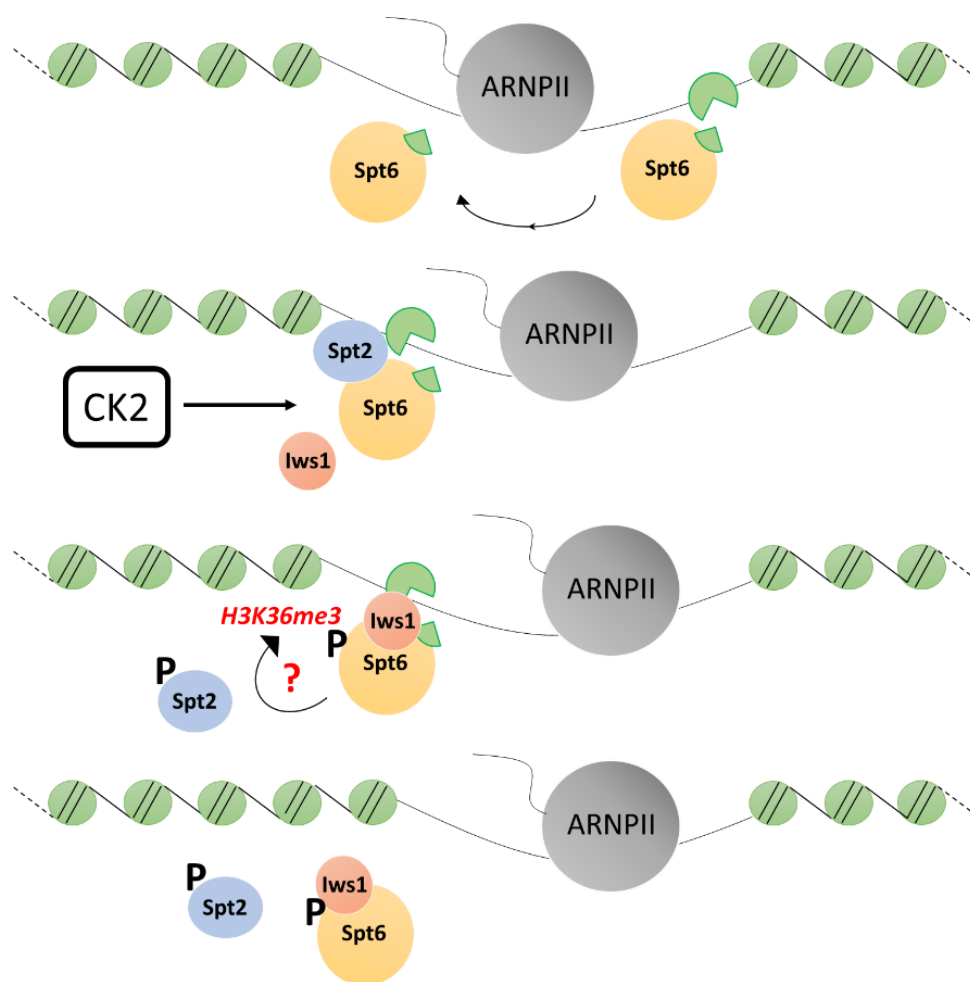


Figure 1.14 : Modèle de travail sur l'implication de CK2 dans la régulation fonctionnelle à la chromatine des chaperons d'histones au cours de l'élongation

CK2 module la fonction de Spt2-Spt6-Iws1 lors de la progression de l'ARNPII afin de favoriser le maintien de l'organisation de la chromatine dans les régions codantes au cours de la phase d'élongation.

Dans ce contexte, des données préliminaires non publiées du laboratoire et la littérature (Krogan et al., 2002) indiquent que le complexe Spt6-Iws1 pourrait également être cible de CK2. Dans la littérature, l'interaction Spt6-Iws1 est proposée d'une part comme un mode

de régulation de l'interaction Spt6-Nucléosomes, et d'autre part comme ayant un rôle majeur dans la triméthylation de H3K36. Ainsi la phosphorylation par CK2 pourrait réguler dans le temps la fonction de Spt6 en favorisant l'interaction Spt6-Iws1 au détriment de l'interaction Spt6-Spt2 et leur relargage de la chromatine, participant ainsi au recyclage des histones et au maintien de l'état épigénétique des régions transcrites (Fig. 1.14). Du fait de ses très nombreux substrats et de son implication dans la régulation de l'expression de nombreux gènes, le réseau de signalisation de CK2 est extrêmement complexe. Nous allons donc focaliser notre étude sur sa modulation des fonctions de plusieurs facteurs impliqués dans la dynamique de la chromatine.

1.6.Hypothèse et objectifs du projet de doctorat

L'homéostasie transcriptionnelle est en grande partie fondée sur la régulation dynamique de la chromatine, qui peut favoriser ou réprimer la transcription par l'ARNP II. L'émergence des techniques de séquençage à haut débit a mis en lumière l'étendue considérable de la transcription non-codante des génomes (Wyers et al., 2005), et notamment la nature promiscuitaire de l'ARNP II. L'organisation précise et contrôlée de la chromatine est cruciale à l'orientation fonctionnelle de la machinerie transcriptionnelle et à la limitation de ses erreurs et des événements de transcription hasardeux. La transcription en elle-même altère la chromatine, et de nombreux facteurs (Spt2, Spt6-Iws1, FACT, Chd1, Set2...) coopèrent pour reconstituer les nucléosomes et maintenir leur organisation dans le sillage de l'ARNP II (Rando and Winston, 2012; Venkatesh and Workman, 2015). Des défaillances dans les fonctions de ces facteurs sont à l'origine de défauts chromatinien qui provoquent l'accumulation de transcrits cryptiques opportunistes, et modifient ainsi le programme transcriptionnel de la cellule.

CK2 est une sérine/thréonine kinase essentielle ayant de nombreuses cibles nucléaires dont de multiples facteurs de transcription (Barz, 2003; Meggio and Pinna, 2003). Elle est surexprimée dans un grand nombre de cancers, motivant l'analyse de son réseau de signalisation complexe. De façon intéressante, des publications récentes associent la

dérégulation de la kinase a des modifications du paysage épigénétique qui favorisent la progression tumorale (Deplus et al., 2014; Wu et al., 2013). De plus, des études réalisées dans divers organismes, allant de la levure aux mammifères, suggèrent que CK2 pourrait moduler la fonction de plusieurs facteurs chromatinien (Basnet et al., 2014; Bouazoune and Brehm, 2005; Calvert et al., 2008; Dastidar et al., 2012; Krogan et al., 2002; Li et al., 2005). Plus particulièrement, des analyses de protéomiques ont montré que CK2 co-purifie avec des facteurs impliqués dans l'organisation de la chromatine au cours de l'élongation et dans la suppression de la transcription cryptique, comme Spt6-Iws1, Spt4-Spt5, FACT, CHD1 (Gavin et al., 2002; Krogan et al., 2002). CK2 phosphoryle également plusieurs sous-unités du complexe PAF en collaboration avec FACT, ce qui pourrait influencer le niveau d'H2Bub dans les régions codantes (Bedard et al., 2016). Enfin, les travaux du laboratoire ont montré que CK2 est impliquée dans la régulation fonctionnelle du chaperon d'histone Spt2, qui participe à l'organisation de la structure de la chromatine au cours de la transcription (Bhat et al., 2013). En effet, CK2 phosphoryle Spt2 et module son interaction avec Spt6 et son recrutement aux régions transcrites de la chromatine (Bhat et al., 2013). L'ensemble de ces observations convergent vers un rôle potentiel de CK2 dans la régulation de la dynamique de la chromatine associée à la transcription. Toutefois, ce rôle reste vague et mal compris et les mécanismes moléculaires engagés sont inconnus.

L'objectif de mon doctorat est de déchiffrer les relations fonctionnelles entre CK2 et les facteurs qui régulent la dynamique de la chromatine lors de l'élongation transcriptionnelle. Ainsi, notre étude a pour but de déterminer si CK2 a un rôle dans la modulation de la chromatine, d'identifier les mécanismes moléculaires éventuellement impliqués et leur importance dans le maintien du programme transcriptionnel. Nous posons plus précisément les questions suivantes : Est-ce que CK2 régule la dynamique de la chromatine des régions transcrites? Si oui, quels sont les mécanismes moléculaires chromatinien et transcriptionnel impliqués dans ces voies de régulations? Enfin, quelles sont les conséquences cellulaires de la défaillance de ces voies de régulation sur l'homéostasie transcriptionnelle? Un mutant thermosensible *ck2^{ts}* est utilisé pour étudier les conséquences de l'inactivation de CK2. Nous avons mené des analyses des fonctions transcriptionnelles du mutant *ck2^{ts}* et de l'impact de la déplétion de CK2 sur des facteurs clés dans la régulation de la structure de la chromatine. Nous avons également réalisé des études *in*

in vitro pour caractériser biochimiquement les phosphorylations dépendantes de CK2 sur ces facteurs et identifier de nouvelles cibles dans le contexte chromatinien.

Nous avons montré que l'inactivation de CK2 entraîne une accumulation de transcrits cryptiques intragéniques et antisens considérable chez la levure. Ce phénotype est associé à un défaut du recyclage co-transcriptionnel de l'histone H3 dans les régions codantes des gènes transcrits. De plus, CK2 phosphoryle et régule directement la fonction du chaperon d'histone essentiel Spt6. L'identification de ces sites potentiels de phosphorylation nous a permis de générer un mutant *spt6* non-phosphorylable qui présente une accumulation de transcrits cryptiques hautement comparable à celle des mutants *ck2^{ts}*. A l'inverse, un mutant Spt6 phosphomimétique restaure partiellement les phénotypes de *ck2^{ts}*. CK2 régule la fonction de Spt6 notamment par la modulation de son niveau protéique dans la cellule, et cette régulation est capitale pour assurer l'efficacité de la réponse transcriptionnelle à des stimuli extérieurs (Chapitre 2).

L'analyse comparée de données de séquençage à haut débit des ARN de mutants *ck2^{ts}* et *spt6* non-phosphorylable montre que le rôle de CK2 dans la suppression de la transcription cryptique s'étend au-delà de la régulation de Spt6. Plusieurs études indiquent que CK2 interagit avec Spt6-Iws1, FACT, Spt4-Spt5, Chd1, PAF (Bedard et al., 2016; Gavin et al., 2002; Krogan et al., 2002; Li et al., 2005). Nous montrons notamment que le partenaire de Spt6, Iws1, est également une cible directe de CK2 mais cette régulation ne semble pas intervenir dans la suppression de la transcription cryptique. En revanche, indépendamment de Spt6, CK2 affecte l'état de phosphorylation des sérines 2 du CTD de l'ARNP II, traduisant une modification de son état d'activation. Cette observation pourrait refléter le rôle additionnel de CK2 dans la suppression de la transcription opportuniste, et soulève notamment la question des interactions fonctionnelle entre CK2 et le complexe PAF, largement impliqué dans la régulation de la phosphorylation des sérines 2 (Chapitre 3).

Ainsi, CK2 participe au maintien de la fidélité du programme transcriptionnel en régulant directement la fonction du chaperon d'histones Spt6 dans la dynamique des nucléosomes, et en conséquence, l'organisation chromatinienne des régions transcrites. En plus de la régulation de Spt6, CK2 est potentiellement impliquée dans la modulation d'autres facteurs organisateurs de la chromatine qui favorisent la précision de l'ARNP II. Enfin, la régulation

fonctionnelle de Spt6 par CK2 est cruciale pour limiter les erreurs de l'ARNP II et optimiser sa fonction, ce qui *in fine*, semble contribuer aux réponses transcriptionnelles face à des signaux de stress, qui sont décisives pour l'efficacité de l'adaptation cellulaire à l'environnement.

Chapitre II: Casein Kinase 2 Mediated Phosphorylation of Spt6 Modulates Histone dynamics and Regulates Spurious Transcription

Emmanuelle Gouot¹, Wajid Bhat¹, Anne Rufiange¹, Eric Fournier¹, Eric Paquet and Amine
Nourani^{1*}

1. Centre de recherche sur le cancer de l'Université Laval, L'Hôtel-Dieu de Québec
(CHUQ), 9 rue McMahon, Québec, Qc G1R 3S3 Canada

*To whom correspondence should be addressed

E-mail: Amine.Nourani@crhdq.ulaval.ca

2.1. Résumé

CK2 est une protéine kinase essentielle hautement conservée dans le domaine eucaryote et impliquée dans des processus cellulaires variés. Différentes études convergent vers un rôle potentiel de CK2 dans la régulation de la dynamique de la chromatine associée à la transcription. Notre étude s'intéresse au rôle de CK2 dans ce processus. Nous montrons que l'inactivation de CK2 conduit à une élévation du niveau d'H3K56 acétylée dans les régions activement transcrites, suggérant un rôle positif de la kinase dans le maintien/recyclage des tétramères H3/H4 lors du processus transcriptionnel. Une analyse par ChIP-seq de l'incorporation de l'histone H3 nouvellement synthétisée nous a permis de mettre en évidence que CK2 inhibe l'échange d'H3 en 3' des régions codantes. Ainsi, CK2 joue un rôle général dans le recyclage des tétramères H3/H4 suite au passage de l'ARNPII. De plus, des analyses à grande échelle de séquençage brin-spécifique des ARN révèlent que CK2 inhibe la transcription cryptique intragénique et antisens sur l'ensemble du génome, soulignant son rôle crucial dans le maintien de l'organisation de la chromatine. De façon intéressante, un des principaux régulateurs chromatinien liés à la transcription, Spt6, interagit fonctionnellement avec CK2. Notre étude démontre que CK2 interagit avec Spt6 et le phosphoryle *in vivo* et *in vitro*, ce qui est important pour les fonctions chromatinien de Spt6, et notamment pour la répression globale de la transcription cryptique intragénique et antisens. Par ailleurs, les transcrits aberrants accumulés dans les cellules déplétées en CK2 ou exprimant un mutant Spt6 non-phosphorylable, sont fortement similaires. Nous montrons que la phosphorylation dépendante de CK2 participe au maintien du niveau protéique de Spt6. En effet, la stabilité du mutant Spt6 non-phosphorylable est altérée, alors que l'expression d'un mutant Spt6 phosphomimétique dans des cellules déplétée en CK2 supprime l'élévation de l'échange d'H3 dans les régions codantes, ainsi que l'accumulation de transcrits opportunistes. Enfin, CK2 et la phosphorylation de Spt6 sont nécessaires à l'efficacité de la réponse transcriptionnelle à divers stimuli extérieurs, suggérant que la production de transcrits aberrants altère la réponse cellulaire aux signaux environnementaux. L'ensemble de nos résultats démontrent que la phosphorylation de Spt6 par CK2 régule la dynamique de la chromatine associée à la transcription, réprimant ainsi les événements transcriptionnels aberrants. L'importance de cette voie de régulation

pourrait résider dans l'optimisation du processus transcriptionnel afin d'en assurer la plasticité et l'efficacité maximale, et par conséquent, favoriser l'adaptabilité des cellules aux changements environnementaux.

2.2. Abstract

CK2 is an essential protein kinase ubiquitously present among eukaryotes and implicated in various cellular processes. Evidence points toward a potential function of this kinase in chromatin dynamics through the regulation of chromatin factors. In this study, we address the role of CK2 in chromatin modulations associated with transcription. We found that CK2 depletion from yeast cells leads to replication-independent increase of histone H3K56 acetylation in transcribed regions of active genes suggesting a positive role of this kinase in maintenance/recycling of the histone H3/H4 tetramers during transcription. Using ChIP-seq to analyze replication-independent newly synthesized H3 incorporation, we further showed that CK2 inhibits H3 turnover in 3' end coding regions. This indicates that CK2 plays a global role in the maintenance of H3/H4 tetramers and chromatin structure in these locations following passage of RNAP II. Interestingly, strand-specific RNA-seq analyses reveal that CK2 inhibits global cryptic promoters located within coding regions driving both sense and antisense transcription. This result further indicates an important role of CK2 in the modulation of chromatin during transcription. Our study shows that CK2 interacts with a major regulator of chromatin refolding in the wake of RNAP II, Spt6, and phosphorylates it *in vivo* and *in vitro*. We mapped the phosphorylation sites and demonstrated that the modification of these residues is important for Spt6 function in the global repression of pervasive transcription. Furthermore, comparison of RNA-seq data obtained in CK2 depleted cells to Spt6 non-phosphorylatable mutant shows a significant overlap in antisense and intragenic sense cryptic transcripts. Interestingly, we show that CK2 phosphorylation maintain cellular levels of Spt6 and mediates the suppression of histone H3 turnover and the inhibition of spurious transcription. Finally, we show that CK2 and Spt6 phosphorylation are required to various transcriptional responses suggesting that cryptic intragenic and antisense transcripts production hinders the ability of cells to respond to environmental cues. Altogether, our data indicate that CK2 mediated phosphorylation of Spt6 regulates chromatin dynamics associated with transcription, and prevents aberrant transcription from cryptic promoters. The importance of this regulation pathway could lie in the optimization of the transcriptional response to ensure maximum plasticity and efficiency, and consequently, enhance cell adaptation to environmental challenges.

2.3. Introduction

All DNA-related processes within the cell such as replication, transcription and repair occur in the context of chromatin. The basic unit of chromatin, the nucleosome, consists of 147 base pairs of DNA wrapped around a histone octamer (Kornberg, 1977). To make DNA accessible to the various macromolecules involved in the processes listed above, cells need to modulate chromatin structure so that the machinery responsible for a particular process gets access to DNA. Different factors can alter chromatin structure; these include histone modifiers, ATP-dependent chromatin remodelers, histone chaperones and histone variants. Modulation of chromatin structure during transcription elongation has been the focus of several studies [reviewed in (Selth et al., 2010; Venkatesh and Workman, 2015)]. Diverse sets of factors have been identified to play important roles in altering chromatin structure during transcription elongation, e.g. Isw1, Isw2, SWI/SNF, Chd1, Spt6, the FACT complex (Spt16-Pob3), Set2, Set1 and the Paf1 complex [reviewed in (Kulaeva et al., 2013; Rando and Winston, 2012; Venkatesh and Workman, 2015)].

Nucleosomes are a major obstacle to transcription elongation (Gaykalova et al., 2015). Cells have developed intricate mechanisms involving histone chaperones (HC) to deal with this challenge. HCs promote disassembly of nucleosomes in front of RNAPII and reassembly in its wake [reviewed in (Avvakumov et al., 2011; Gurard-Levin et al., 2014; Hammond et al., 2017)]. Chromatin reassembly in the wake of transcription is related to the important issue of dealing with the consequences of RNAP II passage (Kireeva et al., 2002; Studitsky et al., 2004). The cell must re-establish chromatin structure to repress a large number of sites that should not allow transcription initiation (Cheung et al., 2008; DeGennaro et al., 2013; Shetty et al., 2017). This spurious transcription may interfere with many important processes such as gene regulation, self-renewal of stem cells, genome stability and viral infections (Camblong et al., 2009; Gérard et al., 2015; Lenstra et al., 2015; Xie et al., 2011). HCs play an important role in the regulation of spurious transcription presumably by reassembling nucleosomes in the wake of RNAP II. Interestingly, recent studies showed that HCs involved in yeast spurious transcription regulation, such as Spt2 and Spt6, use the histone H3/H4 molecules displaced by transcription and recycle them to reassemble nucleosomes following RNAP II passage

(Chen et al., 2015; Kato et al., 2013). This function is of great importance because it contributes to the maintenance of histone marks in transcribed regions and most importantly it blocks the incorporation of newly synthesized histones that are highly acetylated (Rufiange et al., 2007; Venkatesh et al., 2012). Acetylated histones tend to favor initiation from cryptic promoters located within coding regions. Furthermore, in addition to blocking spurious transcription, nucleosome reassembly mediated by HCs, such as Spt6, prevents wrongful localization of the variant histone H2AZ in transcribed units (Jeronimo et al., 2015).

Spt6 is a major conserved H3/H4 HC, essential for the repression of spurious transcription and the maintenance of nucleosomes (Bortvin and Winston, 1996; Cheung et al., 2008; DeGennaro et al., 2013; Ivanovska et al., 2011; Jeronimo et al., 2015; Kaplan et al., 2003; Uwimana et al., 2017). Many questions regarding the function and regulation of Spt6 remain without answers. Interestingly, we have found that Spt6 interacts with the HC Spt2 and that this interaction is regulated by Casein Kinase 2 (CK2) through the phosphorylation of Spt2. CK2 is an essential serine/threonine kinase involved in many cellular processes [reviewed in (Meggio and Pinna, 2003; St-Denis and Litchfield, 2009)]. CK2 is commonly deregulated in cancer, and several studies suggest a link between CK2 dysfunction and epigenetic modulations in favor of the tumorigenesis process (Deplus et al., 2014; Wu et al., 2013). Moreover, it has been shown in different organisms that CK2 interacts with many factors involved in chromatin modulations and may regulates their functions. Studies in *S.cerevisiae* (Basnet et al., 2014; Calvert et al., 2008; Krogan et al., 2002), *P.falciparum* (Dastidar et al., 2012), *Drosophila* (Bouazoune and Brehm, 2005), and mammals (Li et al., 2005) strongly suggest a conserved and extensive role of CK2 in chromatin modulations. However, this role and the concerned molecular mechanisms remain elusive. Importantly, as mentioned previously, we have found that CK2 interacts with Spt2, phosphorylates it and thereby disrupts its interaction with Spt6 (Bhat et al., 2013). We found that this regulation plays a key role in the association of Spt2 with coding regions and into the function of this HC in the repression of spurious transcription in yeast. In addition to the link between CK2, Spt2 and Spt6, this kinase has been directly involved in interactions with other factors that are implicated in chromatin modulations during transcription elongation. Indeed, CK2 cooperates with FACT complex to phosphorylate PAF complex

and may regulate indirectly the level of H2B ubiquitylation in coding regions (Basnet et al., 2014; Bedard et al., 2016). Proteomic analyses show that it also co-purifies with Spt4/Spt5, FACT and other elongation related factors (Gavin et al., 2002; Krogan et al., 2002). Together, these observations strongly suggest a potential role of CK2 in chromatin dynamics during transcription elongation.

In this study, we have specifically addressed the role of CK2 in chromatin dynamics associated with transcription. Using ChIP and ChIP-seq approaches, we have found that CK2 regulates histone H3 dynamics outside of replication, indicating a role in nucleosomes turnover associated with transcription. In cells depleted of CK2 activity, newly synthesized histone H3 are incorporated in transcribed regions at a higher rate than what should be expected in normal cells. As consequence, cryptic sense and antisense transcripts levels are increased in these cells indicating that chromatin refolding in transcribed units is deficient. We next addressed the question of how CK2 regulates this process. We reasoned that CK2 could regulate the function of key factors that are involved in chromatin dynamics associated with transcription. Importantly, we found that it interacts and phosphorylates the HC Spt6, which plays a major role in chromatin refolding during transcription elongation (Cheung et al., 2008; DeGennaro et al., 2013; Jeronimo et al., 2015; Kaplan et al., 2003; Kato et al., 2013). Furthermore, we identified the CK2 phosphorylation sites in Spt6 and showed that mutation of these sites affects the function of this protein. Interestingly, our global analyses of transcripts by RNA-seq indicate that CK2 phosphorylation sites are involved in the regulation of cryptic sense and antisense transcription. Moreover, comparison of CK2 and Spt6 mutant data sets clearly show that CK2 and Spt6 regulate the levels of similar cryptic transcripts suggesting an overlapping function. Surprisingly, we found that Spt6 cellular levels are directly controlled by CK2 and their restoration bypass the need for normal CK2 activity for the repression of cryptic transcription. Finally, we show that CK2 and Spt6 phosphorylation have only limited role in steady state transcription but are rather required for the dynamic response to environmental changes and various stresses. Taken together, our data shows that CK2 regulates the dynamics of chromatin in transcribed regions by modulating the function of Spt6 and adapting the cellular response to external challenges.

2.4. Material and methods

2.4.1. *Saccharomyces cerevisiae* strains and plasmids.

All strains used in this study are isogenic to S288C (Winston et al., 1995) and are listed in Table 2.1. Strains were constructed by standard genetic methods, either by crosses or by transformation. Yeast cells expressing different *SPT6* or *IWS1* alleles were constructed by transformation of *SPT6* or *IWS1*-deleted diploid strains with plasmid containing the indicated alleles followed by tetrad dissection. *SPT6-FLAG*, *CKA1-13MYC*, *CKA2-13MYC*, *IWS1-13MYC* *CKB2-TAP*, alleles were constructed by integrating the DNA encoding the particular epitope at the 3'-end of the respective gene (Longtine et al., 1998; Puig et al., 2001). The *cka1Δ::KANMX6*, *spt6Δ::KANMX6*, *iws1Δ::KANMX6* and *bar1Δ::NatMX4* alleles were constructed by replacing the open reading frame with *KANMX6* or *NatMX4* selection marker (Longtine et al., 1998, Goldstein et al., 1999). The point mutation in the *CKA2* allele (D225N) was introduced as described in (Kitazono et al., 2002) with *NatMX6* as a selection marker.

The plasmids were constructed using standard molecular biology techniques. 6-His fusion plasmids were constructed by insertion of PCR amplified fragments into the appropriate sites of the *pet15b* vectors (Novagen); the plasmids *pRS416* and *pRS415* (Sikorski et al., 1989) expressing *IWS1-MYC* as well. The *pCC11 SPT6* WT plasmid is described elsewhere (Clark-Adams and Winston, 1987). Plasmids expressing *Spt6* and *Iws1* phosphomutants were generated by mutagenesis of *pCC11* and *pRS416/415* using Quik Change Multi Site-Directed Mutagenesis Kit from Agilent Technologies following the manufacturer's protocol. All mutations were verified by sequencing. *FLAG-SPT6* was amplified from genomic DNA and inserted in the *YCp50* plasmid. Plasmid *YCp* has been described elsewhere (Rose et al., 1987). Growth of different strains was monitored by spot tests on the indicated medium

2.4.2. Western blot and antibodies.

Proteins were extracted in the presence of trichloroacetic acid, electrophoresed on 8 to 15% SDS-PAGE gels, and transferred to nitrocellulose membrane. Membranes were incubated with anti p-Ser5 (Millipore clone 3E8, 04-1572), anti p-Ser2 (Millipore clone 3E10, 04-1571), anti Rpb1 (8WG16 Covance, MMS-126R), anti Pgk1 (Invitrogen 459250) anti-H3 (Abcam Ab1791), anti-Flag (Sigma F3165), anti-Myc (Covance MMS-150R), anti-Tap (Open Biosystems CAB1001), anti His (Clontech 631212). Ponceau red staining and Pgk1 signal were used to determine equal loading.

2.4.3. Protein purification and *in vitro* phosphorylation assay

Recombinant 6His-tagged proteins were expressed in Escherichia coli BL21 bacteria and purified with Ni²⁺-nitrilotriacetic acid (NTA)-agarose (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Tandem affinity purification (TAP) of Ckb2 was done as described previously (Puig et al., 2001). *In vitro* phosphorylation of recombinant proteins was done as described previously (Bhat et al., 2013). His-tagged recombinant proteins (1 µg) were incubated for 30 min at 30°C with CK2 purified from yeast in kinase buffer (final concentration of 80 mM NaCl-KCl, 25 mM Tris-HCl [pH 8], 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 µM cold ATP, and 1 µCi [γ -³²P]ATP). Samples were run on 10% SDS-PAGE gels, blotted onto nitrocellulose, dried, and exposed to film.

2.4.4. Immunoprecipitation experiments

Co-immunoprecipitation assays were performed as described previously (Nourani et al., 2001). Briefly, 10 µl of anti-Flag M2 agarose beads were incubated overnight at 4°C with yeast whole-cell extract (WCE) (5 mg of total protein) in binding buffer (20 mM HEPES [pH 7.5], 300 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 2 µg/ml of leupeptin and pepstatin, 5 µg/ml of aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF]). Beads were washed three times with the binding buffer. Bound proteins were analyzed by Western blotting. For

His pulldown assay, 300 ng of recombinant 6xHis-Spt6 or 6xHis-Iws1 coupled to Ni-NTA agar beads were incubated with an equal amount of Ckb2-TAP purified from yeast in pulldown buffer (20 mM Hepes (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 100 µg/ml BSA, 0.5 mM DTT, 0.1% NP-40, and 2 µg/ml each of leupeptin and pepstatin, 5 µg/ml aprotinin) for 3 h at 4°C. Beads were washed three times with pulldown buffer and bound proteins were analyzed by western blot with an antibody against TAP-tag.

2.4.5. Protein Stability Assay

Cells were grown to midlog phase in synthetic medium with 2% glucose as the carbon source. The cells were grown overnight and reinoculated in 50ml fresh media with 0.003% SDS at OD₆₀₀ 0.5 during 3h. Temperature was shifted to 37°C, cycloheximide (Sigma, 7698) was added to a final concentration of 40 µg/ml to stop protein synthesis, and cells were harvested at different time points. Cell lysates were prepared in lysis buffer, and protein concentration was determined using the Bradford assay. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using the same amount of total proteins from each time point.

2.4.6. Stress induction assays

For galactose induction, strains were grown in YP 2% raffinose, to an OD₆₀₀ of 0.8, G1 arrested with α factor and shifted to 37°C for 30 minutes, then galactose was added to a final concentration of 2%, and cells were harvest at the indicated time. For heat shock induction, strains were grown at 24°C in YPD to an OD₆₀₀ of 0.8, G1 arrested with α factor and shifted to 37°C for 30 minutes. Cells were harvest at the indicated time. For amino-acid starvation, cells were grown in synthetic media lacking histidine (SC-HIS) to an OD₆₀₀ of 0.8 and shifted or not to 37°C for 30 minutes. Then 3-aminotriazole (3AT, Sigma A8056) was added to the final concentration of 40mM and cells were harvest after 1h of treatment.

2.4.7. Chromatin Immunopurification (ChIP)

ChIP experiments were performed as described previously (Rufiange et al., 2007). Efficient G1 arrest (at least 95%) of yeast cells was achieved by adding 500 ng/mL α factor for 2–3 h. Immunoprecipitation of Rpb1 was performed using 1 μ L of the 8WG16 anti-CTD antibody per immunoprecipitation (Covance, MMS-126R). Antibodies against p-Ser5 (3E8, 04-1572) and p-Ser2 CTD (3E10, 04-1571) were purchased from Millipore and ChIP was performed using 2 μ l per immunoprecipitation. The immunoprecipitations of H3 and H3K56ac were done with 0.5 μ L of anti-H3 antibody per immunoprecipitation (Abcam, 1791) and 0.2 μ L of anti-H3K56 antibody per immunoprecipitation (Millipore, 07-677-I), respectively. Finally, the Flag ChIPs were done using 10 μ L of anti-Flag agarose beads per immunoprecipitation (Sigma, A2220), and Myc ChIPs were done using 1 μ L of anti-Myc 9E10 per immunoprecipitation (Covance monoclonal antibodies, MMS-150R). ChIP experiments were analysed by qPCR with oligonucleotides listed in Table 2.2. All ChIP experiments were done at least in triplicates; P -value < 0.05 (*), P -value < 0.01 (**), and P -value < 0.001 (***)).

2.4.8. RNA analyses

Total RNA was isolated using the hot-phenol method. In Northern blot analyses, 20 to 40 μ g of RNA were separated on a 1% agarose formaldehyde-MOPS gel and transferred to a nylon membrane. The *FLO8*, *SCR1*, *DDC1*, *SPB4*, *PHO84* and *YML122C* probes were amplified by PCR and radiolabeled by random priming. For RT-quantitative PCR (qPCR) quantifications, cDNAs were generated using the Invitrogen M-MLV reverse transcriptase kit and their levels were measured by real-time PCR using LightCycler 480 Sybr green I master kit purchased from Roche. Sequences of the oligonucleotides used in RT-qPCR are available in Table 2.2. All RT-qPCR experiments were done at least in triplicates; P -value < 0.05 (*), P -value < 0.01 (**), and P -value < 0.001 (***)). RNA-seq experiments were performed following TruSeq stranded total RNA illumina protocol and Illumina next generation sequencing was performed as 50 base pairs single-end reads (McGill University Genome Innovation Centre, HiSeq 2000).

2.4.9. RNAseq data processing

The sequenced reads from each sample were preprocessed with Trimmomatic (Bolger et al., 2014) and aligned with bwa (Li et al., 2009) to *S-cerevisiae* genome assembly R64-1-1 (GCA_000146045.2). The numbers of reads for each exon annotated in Ensembl Release 77 was calculated for both the sense and antisense strands. Differential expression of gene was assessed using DESeq (Anders and Hubers, 2010). The subset of reads falling within the 5'-most and 3'-most 10% of each exons were also calculated. To avoid confounding effects from non-cryptic antisense transcription and splicing, polyexonic and overlapping genes were excluded from further analyses. Furthermore, to reduce the amount of noise from inactive genes, genes with fewer than 20 reads in their 5' region or 10 reads in their 3' region were also excluded. For each gene, the following metrics were calculated: Antisense Ratio = $\log_2 (\text{Reads}_{\text{antisense}} / \text{Reads}_{\text{sense}})$, Antisense Enrichment = Antisense Ratio_{CK2/Spt6} – Antisense Ratio_{WT}, Three Prime Ratio = $\log_2 (\text{Reads}_{3'} / \text{Reads}_{5'})$, Three Prime Enrichment = Three Prime Ratio_{CK2/Spt6} – Three Prime Ratio_{WT}.

2.4.10. ChIP Seq analyses

Illumina next generation sequencing was performed as 50 base pairs single-end reads (McGill University Genome Innovation Centre, HiSeq 2000). The sequenced reads were aligned to the *S-cerevisiae* genome assembly R64-1-1 (GCA_000146045.2) using bowtie v0.12.8. Coverage was calculated using bedtools (<http://bedtools.readthedocs.io/>) and was normalized into reads-per-million. Metagenes plotting the average coverage for the genomic regions 1000bp upstream to 4000bp downstream of all annotated TSS were then produced.

Tableau 2.1 : Yeast strains

Name	Mating Type	Genotype
YAR 489	mat a	leu2 Δ1 lys2-128 δ bar1 Δ::NAT ura3-52::HHF1-PGAL1/10-FLAG-HHT1-URA3
YAR 490	mat a	leu2 Δ1 lys2-128 δ bar1 Δ::NAT cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT ura3-52::HHF1-PGAL1/10-FLAG-HHT1-URA3
YEG101	mat α	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ cka1-13MYC ::KanMX6
YEG102	mat α	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ cka2-13MYC ::KanMX6
YEG103	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ cka1-13MYC ::KanMX6 SPT6-FLAG::KanMX6
YEG104	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ cka2-13MYC ::KanMX6 SPT6-FLAG::KanMX6
YEG105	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ spt6 Δ::kanMX6/pcc11 (CEN, URA3, FLAG-SPT6 WT) KanMX4::GAL1pr-FLO8::HIS3
YEG106	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ spt6 Δ::kanMX6/pcc11 (CEN, URA3, FLAG-spt6 3S-A) KanMX4::GAL1pr-FLO8::HIS3
YEG107	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ spt6 Δ::kanMX6/pcc11 (CEN, URA3, FLAG-spt6 4S-A) KanMX4::GAL1pr-FLO8::HIS3
YEG108	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ spt6 Δ::kanMX6/pcc11 (CEN, URA3, FLAG-spt6 7S-A) KanMX4::GAL1pr-FLO8::HIS3
YEG109	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ spt6 Δ::kanMX6/pcc11 (CEN, URA3, FLAG-spt6 3S-D) KanMX4::GAL1pr-FLO8::HIS3
YEG110	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ spt6 Δ::kanMX6/pcc11 (CEN, URA3, FLAG-spt6 4S-D) KanMX4::GAL1pr-FLO8::HIS3
YEG111	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ spt6 Δ::kanMX6/pcc11 (CEN, URA3, FLAG-spt6 7S-D) KanMX4::GAL1pr-FLO8::HIS3
YEG61	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ bar1 Δ::KanMX6 spt6 Δ::kanMX6/pcc11 (CEN, URA3, FLAG-SPT6 WT) IWS1-13MYC::HIS3
YEG62	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ bar1 Δ::KanMX6 spt6 Δ::kanMX6/pcc11 (CEN, URA3, FLAG-spt6 7S-A) IWS1-13MYC::HIS3
YEG63	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ bar1 Δ::KanMX6 spt6 Δ::kanMX6/pcc11 (CEN, URA3, FLAG-spt6 7S-D) IWS1-13MYC::HIS3
YEG66	mat a	cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ bar1 Δ::KanMX6 spt6 Δ::kanMX6/pcc11 (CEN, URA3, FLAG-SPT6 WT)
YEG112	mat a	ura3-52 leu2 Δ1 lys2-128 δ bar1 Δ::NAT cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT
YAN80	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ
YTS07	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT
YTS05	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ cka1Δ0::KanMX6
YAR 867	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ cka2D225N::NAT
YAN135	mat α	ura3 Δ10 his3 Δ200 lys2-128 δ leu2 Δ10 FLAG-spt6-1004 SPT2-13MYC::KANMX6
YEG64	Diploïde WT	(his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ)x2_spt6 Δ::kanMX6/SPT6 WT
YAR593	Diploïde Spt6Δ	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2 Δ1 lys2-128 δ bar1 Δ::KanMX6 IWS1-13MYC::HIS3
YGB226	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2Δ1 lys2-128 bar1 Δ::KanMX6 IWS1-13MYC::HIS3
YEG15	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2Δ1 lys2-128 bar1 Δ::KanMX6 IWS1-13MYC::HIS3 cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT
YAR487	mat a	ura3Δ0 his3 Δ200 leu2Δ1 lys2-128 IWS1-13MYC::HIS3 cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT
YAR488	mat α	ura3Δ0 his3 WT leu2Δ0 lys2-128 trp1Δ63 IWS1-13MYC::HIS3 bar1Δ::NATMX4
YAR491	mat α	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2Δ1 lys2-128 cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT IWS1-13MYC::HIS3
YAR493	mat α	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2Δ1 lys2-128 δ IWS1-13MYC::HIS3 bar1 Δ::KanMX6 spt6 Δ::kanMX6/pcc11 (CEN, URA3, FLAG-SPT6 WT)
YAR864	mat a	his3 Δ200 ura3Δ0 leu2Δ1 lys2-128 IWS1-13MYC::HIS3 bar1 Δ::KanMX6 spt6 Δ::kanMX6/pcc11 (CEN, URA3, FLAG-SPT6 WT) cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT
YAR865	mat a	ura3Δ0 his3 Δ200 leu2Δ1 lys2-128 IWS1-13MYC::HIS3 bar1 Δ::KanMX6 spt6 Δ::kanMX6/pcc11 (CEN, URA3, FLAG-SPT6 WT) cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT

Tableau 2.2 : Sequence of oligonucleotides used in the study

	Locus	Forward	Reverse
ChIP qPCR	<i>NoORF</i>	GGCTGTCAGAATATGGGGCCGTAGTA	CACCCCGAAGCTGCTTTCACAATAC
	<i>PMA1</i>	CTATTATTGATGCTTTGAAGACCTCCAG	TGCCCAAATAATAGACATACCCATAA
	<i>ACT1</i>	CTCTTACCTCACGCCATTT	GAGCAGCGTTTTGCATTT
	<i>CLN3</i>	CACCGCCACTGCCGCTC	GGGAAAGACGGAAATAGTGG
	<i>AZR1</i>	GCAAACCTTAATGGGTGG	TACCTGCTAACACTACC
	<i>FKS1</i>	GGACTGGTAAGTGGTATG	CAGAGAGTAAATTGGGGG
	<i>GAL1</i>	ACTGCCGACGAAGACTTT	CCCCTGGAACCAAGTGAA
	<i>GAL2</i>	TTCACTCAGTAAAGATTCCC	CAGCCAAACATGAAGCCGCC
	<i>HSP104</i>	CTGATACGAACACACCTTTGGA	CGCCTTGTAAAGATAGTGGGA
RTqPCR	<i>SCR1</i>	GTCCGTCTGAAGTGTCC	CTTGCACAATTATCCGAC
	<i>FKS1 5'</i>	GAATAGAGTCATTACGCC	GAATACATCATCCCAGAC
	<i>FKS1 3'</i>	GGACTGGTAAGTGGTATG	CAGAGAGTAAATTGGGGG
	<i>PMA1 5'</i>	CCTCTTCATCATCCTCTTC	CGGCGGCAACTGGACCATCGT
	<i>PMA1 3'</i>	CTATTATTGATGCTTTGAAGACCTCCAG	TGCCCAAATAATAGACATACCCATAA
	<i>SPO23 5'</i>	ACAAAGCGAGATAAGGCA	GGATTTTCGTACAGCCGT
	<i>SPO23 3'</i>	AACCTATGCGGATGGTCT	CGAAATATCACTATCGCC
	<i>MAL33 5'</i>	AAAGTTGTACGGCAGCGG	GCTAAGATTGGCTGCTGA
	<i>MAL33 3'</i>	AAGGATATGCTGGACGAC	GGGAGAAAACGAACTTGG
	<i>FLO8 5'</i>	CAGAGGTGGCTCAGAGTT	CGCAGGTGCCATAGGATT
	<i>FLO8 3'</i>	CCTCGTCTGGTGACGCT	GCCTCCAGTATGTTTCCC
	<i>GAL1</i>	ACTGCCGACGAAGACTTT	CCCCTGGAACCAAGTGAA
	<i>GAL2</i>	TTCACTCAGTAAAGATTCCC	CAGCCAAACATGAAGCCGCC
	<i>HSP104</i>	CTGATACGAACACACCTTTGGA	CGCCTTGTAAAGATAGTGGGA
	<i>ADE1</i>	GCTGGTGGGTGAAGATTTGT	TATAAGAGGGACCACCGTTCCAG
	<i>HIS4</i>	ATTGCCGATGAAGATGCCGA	GCTTCTTCGTAACCGTCACA
	<i>ARG1</i>	TACGAACAGGCTCCATTGAC	CCGATTTTGGGATGGTTGG
<i>ATR1</i>	TTTGGATGGGGCTCTTTTGG	CTACCAGTAAGGCGGCAATA	
Northern probes	<i>SCR1</i>	ATGATCAACTTAGCCAGGACATCCATA	GTTCAACTAGCGAAGCCGCCAAATTA
	<i>FLO8</i>	TGATGCCACTAAGGATGAGAATAA	GGTCTTCAACCATACCAATATTCC
	<i>DDC1</i>	GACATTGGTACGACTCATGAAGTGGC	GAATTCAACAGACCTTGCATATGCTT
	<i>SPB4</i>	GTGGTCAGATAAAACATTGACGAAAG	GTCAAAATTGCCTTGGATAGCTTTGC
	<i>PHO84</i>	CGGTGGTGACTACCCACTAT	TGGCACCGACCTTACCAGAT
	<i>YML122C</i>	GCCAAGAAATGACAGCAATCA	AAGCAGGCAAACGGGAGAA

2.5. Results

2.5.1. CK2 regulates replication-independent H3K56 acetylation in transcribed regions

Several reports involved CK2 functionally and physically with chromatin regulators including Spt2 and Spt6 histone chaperones (Bhat et al., 2013; Calvert et al., 2008; Krogan et al., 2002; Li et al., 2005). Importantly, we and others found that Spt2 and Spt6 maintain the histone H3/H4 tetramer in coding regions by repressing replication-independent H3 exchange and turnover at several genes (Chen et al., 2015; Ferrari and Strubin, 2015; Kato et al., 2013). Whether CK2 is implicated in histone H3 dynamics is not known. In order to address this question, we analyzed, *in vivo*, the role of CK2 in the regulation of H3/H4 exchange in G1 arrested cells. Because histone H3/H4 turnover is tightly associated with H3K56ac level outside of S-phase (Rufiange et al., 2007), we first assessed by ChIP assays the level of H3K56ac in G1 arrested cells in wild type or *ck2^{ts}* mutant. As shown in Figure 2.1A, depletion of CK2 activity is associated with higher level of new H3K56ac in the coding regions of transcribed genes *PMA1*, *CLN3* and *ACT1*. In contrast with that, no such effect is observed in the non-transcribed intergenic region of chromosome V. Hence, our data strongly suggest that CK2 control the histone H3 exchange.

2.5.2. CK2 prevents global histone exchange in 3'end of genes

We tested directly the H3 exchange (Fig. 2.1B and C) by measuring the level of newly synthesized histone Flag-H3 incorporation at various locations in G1 arrested cells as described previously (Rufiange et al., 2007). Upon galactose induction in G1 arrested cells, Flag-H3 is synthesized and incorporated in the genome mainly at the 5' and 3' transcribed regions of genes (Dion et al., 2007; Rufiange et al., 2007). ChIP-qPCR assays, show that similarly to H3K56ac, depletion of CK2 resulted in higher incorporation of new Flag-H3

into coding regions of active genes (Fig 2.1C). This observation confirms that CK2 prevents histone exchange in the coding regions of *PMA1*, *ACT1* and *CLN3* genes. Then, we analyzed the global exchange in wild type and *ck2^{ts}* by Flag-H3 ChIP-seq in G1 arrested cells. Metagene analyses of replication-independent Flag-H3 incorporation indicate that CK2 inhibition leads to increased level of new H3 association (Fig 2.1D). This experiment was performed twice with similar results as shown in Figure 2.S1A. Interestingly, this effect is globally localized in 3' end of genes as further illustrated in Figure 2.1E showing two different regions containing *ATP1* and *ACO1* genes.

2.5.3. CK2 inhibits antisense transcription

Our observation regarding the role of CK2 in histone H3 dynamics suggest a potential global role of this kinase in the regulation of transcription. To further analyze the role of CK2 in yeast transcription at high resolution, we performed strand-specific RNA-seq comparing WT to *ck2^{ts}* at restrictive temperature. A number of changes were observed in the RNA levels of protein encoding genes. With a two-fold change cutoff, we found the levels of 643 genes decreased while those of 670 genes were increased. Interestingly, many of the genes positively affected by CK2 depletion are lowly expressed and most of the losses in expression levels are observed in highly expressed genes (Fig 2.2A). However, the striking change in CK2-depleted cells is observed in antisense transcription. While wild type and *ck2^{ts}* sense transcripts show high level of similarity, the Pearson correlation between WT antisense transcripts and *ck2^{ts}* is significantly reduced (Fig 2.2B). This effect to antisense transcripts levels was further confirmed by metagene analysis aligning sense and antisense transcripts to transcription start site (Fig 2.2C). Antisense enrichment relative to WT has been calculated for each gene in *ck2^{ts}* mutant, and 1326 out of 6572 genes showed at least 2-fold increase in their antisense ratio. This experiment was performed twice with similar results each time and the correlation between the two experiments is excellent ($r=0.98$) as shown in Figure 2.S2. To validate the RNA-seq data regarding the altered antisense transcription we analyzed an interesting locus located in chromosome XIII containing *PHO84* and *YML122C* genes (Fig 2.2D). *PHO84* antisense transcription

produces a long transcript that extend into *YML122C* (Camblong et al., 2009, 2007). We conducted Northern blot analyses of *PHO84* and *YML122C* in WT and *ck2^{ts}* cells. In the condition of our experiment, *YML122C* is not transcriptionally active and no sense or antisense transcripts from this gene are observed in WT cells. However, depletion of CK2 results in the production of a long antisense transcript starting in *PHO84* and extend into *YML122C* (Fig 2.2E). The observation of the transcript revealed by an *YML122C* probe in *ck2^{ts}* cells confirms the RNA-seq data obtained for this locus and further indicates that CK2 inhibits antisense transcription.

2.5.4. CK2 represses spurious transcription from intragenic cryptic promoters

Recent studies highlighted the role of many chromatin remodelers and HCs in the repression of cryptic transcription and established a clear link between chromatin structure regulation in the transcription unit and the repression of both antisense and sense cryptic transcription from within coding regions (DeGennaro et al., 2013; Jeronimo et al., 2015; Uwimana et al., 2017; van Bakel et al., 2013). Because CK2 regulates antisense transcription similar to chromatin regulators, we wanted to know if CK2 depletion was also associated with sense spurious transcription from known cryptic promoters. For that, we first analyzed the *FLO8* model gene containing well characterized sense cryptic promoters in its coding region (Cheung et al., 2008; Kaplan et al., 2003). *FLO8* cryptic promoters located within its coding region are activated when chromatin is not properly refolded after RNAP II transcriptional elongation (Carrozza et al., 2005; Cheung et al., 2008; Kaplan et al., 2003). Northern blot analyses were performed on total RNA isolated from wild type, *ck2^{ts}* and *spt6-1004* cells as control (Fig 2.2F). These analyses show as expected high levels of *FLO8* short cryptic transcripts in *spt6-1004* cells grown at restrictive temperature, indicating the activation of the sense cryptic promoters. Interestingly, in the *ck2^{ts}* cells, we observe strong signal indicating the presence of short cryptic transcripts. These results show that CK2 plays a crucial role in the repression of spurious transcription from *FLO8* cryptic promoters and contributes in the maintenance of proper chromatin structure in coding regions. We next analyzed our RNA-seq data to look for a potential global role of

CK2 in the regulation of intragenic spurious transcription. Previous studies showed that derepression of sense cryptic intragenic transcription results in the enrichment of transcripts initiated in the 3' end of genes leading to a global alteration in the 3'/5' transcripts ratio signal (Cheung et al., 2008; Uwimana et al., 2017). To address the role of CK2 in cryptic transcription, we generated a ratio of 3' over 5' RNA-seq sense signal to obtain a value for each gene. These values were highly reproducible as shown by the pairwise correlations between each replicate (Fig 2.S3). When comparing WT and *ck2^{ts}* 3'/5' ratios, we identified 650 genes in *ck2^{ts}* with 50% increase. Representative of genes with altered ratio or 3' enrichment relative to WT are shown in Figure 2.2G. To validate our results, we used different approaches. First, we assessed the 3'/5' expression ratio by RT-qPCR at two genes exhibiting, in our RNA-seq data, a substantial 3' enrichment in *ck2^{ts}*, *SPO23*, and *MAL33*. *FLO8* is used as positive 3' enrichment control, *PMA1* and *FKS1* as negative 3' enrichment controls (Fig 2.2H). As expected for *FLO8*, *SPO23* and *MAL33*, CK2 depletion led to an alteration in the 3'/5' transcript ratio suggesting that this kinase represses cryptic transcription from within these genes. As second approach to further confirm our analyses, we tested spurious transcription by Northern blot probing specific genes. Our RNA-seq data predicted spurious initiation at *DDC1* and *SPB4* in *ck2^{ts}* mutant. Interestingly, several spurious cryptic transcripts produced from these genes were identified in previous studies (Cheung et al., 2008; Uwimana et al., 2017). Using 3' end specific probes, we found clear bands indicating short transcripts initiated from cryptic promoters of *FLO8*, *DDC1* and *SPB4* (Fig 2.2I). These observations further confirm that CK2 is essential for the repression of spurious transcription from cryptic promoters located within the coding regions of genes.

2.5.5. CK2 interacts with and phosphorylates the transcription elongation associated histone chaperone Spt6

Our data indicate a global role of CK2 in the modulation of chromatin structure during transcription elongation. We next aimed to address the mechanism responsible for the effect of CK2 activity in this process. Several observations initially suggested that CK2 might fulfill this function by regulating Spt6 activity. First, Spt6 is one of the most

important chromatin organizer in the coding regions of genes throughout evolution (DeGennaro et al., 2013; Gérard et al., 2015; Yoh et al., 2008). Second, we established that CK2 regulates the Spt6-Spt2 interaction during elongation (Bhat et al., 2013). Third, peptides from the various subunits of CK2 have been identified by mass spectrometry in tandem affinity-purified Spt6 samples (Gavin et al., 2002; Krogan et al., 2002). Fourth, Spt6 was found phosphorylated at three CK2 consensus motifs (Krogan et al., 2002). To investigate the functional relationship between CK2 and Spt6, we first assessed whether this kinase stably interacts with Spt6 *in vivo*. For this purpose, we purified FLAG-Spt6 from yeast strains containing two epitope-tagged CK2 subunits. As shown in Figure 2.3A, the CK2 subunits Cka1-Myc and Cka2-Myc co-purified with FLAG-Spt6. To test if this interaction was direct, we performed a His pulldown assay using purified 6xHis-Spt6. Ckb2 purified from yeast by TAP was incubated with 6xHis-Spt6 coupled with Ni-NTA agarose. As shown in Figure 2.3B, Ckb2-TAP interacts with 6xHis-Spt6. This observation led us to conclude that CK2 interacts directly with Spt6 *in vivo*.

We next determined whether Spt6 is phosphorylated by CK2 using an *in vitro* phosphorylation assay with recombinant 6xHis-Spt6 and tandem affinity-purified Ckb2 from yeast. CK2 was able to incorporate [γ]-³²Pi into Spt6, as shown in Figure 2.3C. This clearly indicates that Spt6 is a direct substrate for CK2 *in vitro* and suggests that this kinase might phosphorylate Spt6 *in vivo*. Interestingly, it has previously been shown that Spt6 is a phosphoprotein *in vivo*. In fact, Spt6 is phosphorylated at various CK2 consensus motifs (Albuquerque et al., 2008; Krogan et al., 2002). To investigate if Spt6 is phosphorylated by CK2 *in vivo*, we immunopurified FLAG-Spt6 from WT and *ck2^{ts}* yeast strains and analyzed the purified material by western blot with an antibody against phosphoserine/phosphothreonine. As shown in Figure 2.3D, Spt6 was clearly recognized by the anti-phosphoserine/phosphothreonine in WT extracts, further confirming that Spt6 is indeed a phosphoprotein *in vivo*. This signal was significantly altered in the *ck2^{ts}* mutant at the restrictive temperature, suggesting an important role for CK2 in the regulation of the phosphorylation state of Spt6 *in vivo*. Taken together, our data clearly indicate that CK2 interacts directly with Spt6 and phosphorylates this elongation factor both *in vitro* and *in vivo*.

Next, we aimed to identify the sites in Spt6 that are phosphorylated by CK2. Previously, 3 potential CK2 phosphorylation sites (S94, S134 and S206) in Spt6 were shown to be indeed modified *in vivo* (Krogan et al., 2002). We analyzed by mass spectrometry the phosphorylation profile of Spt6 and confirmed that at least two sites (S94, S134) were indeed modified *in vivo* (Fig 2.S4). Interestingly, our mass spectrometry analyses allowed the identification of at least another site in N-terminal region of Spt6: S155 (Fig 2.S4). Moreover, five CK2 phosphorylation target sites have been reported for Spt6 *in vivo* (Albuquerque et al., 2008; X. Li et al., 2007). Notably, all the above-mentioned phosphorylation sites are located in the N-terminal region of Spt6. Furthermore, using the NetPhos 3.1 server, we predicted a total of 7 potential CK2 target sites in the N-terminal region of Spt6 (Figure 2.3E). We therefore elected to mutate either the 3 initially identified, or all 7 potential CK2 target sites to alanine residues to produce and collect the resulting recombinant protein. Then, we subjected the two mutant proteins to *in vitro* phosphorylation by purified CK2 from yeast. As shown in Figure 2.3F, the Spt6 mutant in which the 3 initial CK2 target sites had been eliminated exhibited a reduced but residual level of phosphorylation, while no $[\gamma]$ - ^{32}P i was incorporated into a mutant Spt6 protein in which all 7 CK2 potential target sites had been eliminated, indicating that these sites include all CK2 phosphorylation sites used *in vitro*.

2.5.6. Phosphorylation by CK2 regulates Spt6 function

To analyze the potential function of the identified CK2 target sites, we constructed strains expressing Spt6 mutant forms. To get molecular insight on the role of CK2-mediated Spt6 phosphorylation, we probed a set of phenotypes associated with Spt6 function. One aspect of the *SPT* phenotype is a defect in Spt6 function that suppresses δ insertion mutations in the promoter of the *LYS2* genes. Thus, a WT strain with a *lys2-128 δ* allele is unable to grow in the absence of lysine. A defect in Spt6 function suppresses this phenotype and the strain is no longer auxotrophic for lysine (Clark-Adams and Winston, 1987).

As shown in Figure 2.4A, cells expressing *spt6 7S-A* mutant exhibit thermosensitivity, and a *spt-* phenotype (loss of lysine auxotrophy) on SC-LYS. An *spt-* phenotype indicates

defect in Spt6 function associated with chromatin organization (McCullough et al., 2015). The *spt6 7S-A* growth defect at 39°C indicate fitness defect associate with partial loss of Spt6 function. Defective Spt6 function is also associated with spurious transcription from cryptic promoters within the coding region of transcriptionally active genes (Cheung et al., 2008). We analyzed the consequence of the expression of non phosphorylatable Spt6 mutant on the repression of intragenic cryptic promoter at *FLO8* using the reporter system *pGAL1-FLO8-HIS3*. The expression from the *FLO8* cryptic promoter, as measured by growth in the absence of histidine, indicates spurious transcription (Fig 2.4B), reflecting a defect in chromatin refolding during transcription. We also analyzed cryptic transcription at *FLO8* by Northern Blot and detected short cryptic transcripts in yeast expressing *spt6 7S-A* (Fig 2.4C). *Spt6-1004* allele was used as positive control (Cheung et al., 2008; Jeronimo et al., 2015). This result shows that CK2 target sites found in the N-terminal region of Spt6 are important for Spt6 chromatin functions. Finally, we assessed by ChIP assays the level of H3K56ac in G1 arrested cells in WT or *spt6 7S-A* mutant. As shown in Figure 2.4D, inhibition of Spt6 phosphorylation by CK2 is associated with higher specific incorporation of new H3K56ac in the coding regions of transcribed genes (non-transcribed intergenic region of chromosome V is used as negative control). Our data strongly suggest that CK2-dependant phosphorylation of Spt6 N-terminal region is involved in the modulation of histone H3 dynamics during transcription. Taken together, these data show that CK2 phosphorylation sites of Spt6 N-terminal region are required for Spt6 chromatin functions.

2.5.7. Spt6 phosphorylation sites play an essential role in the repression of antisense and cryptic transcription

To characterize further the role CK2-dependent Spt6 phosphorylation in transcription at high resolution, we performed strand-specific RNA-seq in mutant comparing WT to *spt6 7S-A*. We found the transcripts levels of 161 genes decreased while 180 were increased. As shown in Figure 2.5A, most of the genes negatively affected in *spt6 7S-A* mutant are among the most transcribed. Inversely, genes that are induced belongs to the group of mildly expressed (Fig 2.5A). Interestingly, such effect is similar to what we observed in CK2

depleted cells. We next analyzed the data by comparing WT and *spt6 7S-A* sense and antisense transcripts. Also, similar to what have been found in *ck2^{ts}* cell, the Pearson correlation between WT and *spt6 7S-A* data sets is significantly reduced for the antisense transcripts (Fig 2.5B). The metagene analyses aligning sense and antisense transcripts to transcription start site further confirmed that the most striking effect of *spt6 7S-A* mutation is to antisense transcription (Fig 2.5C). Next, we confirmed our global data by testing antisense transcription in a specific locus. As for *ck2^{ts}*, this RNA-seq analysis show that *spt6 7S-A* allele is associated with a significant induction of antisense transcription in *PHO84* locus (Fig 2.5D). We probed for the gene *YML122C* located upstream of *PHO84*. This gene is not transcriptionally active, no sense or antisense transcripts are observed unless antisense transcript initiates from *PHO84* coding region and extends into *YML122C* (Fig 2.5E). In *spt6 7S-A* allele, a probe located in *YML122C* revealed a long antisense transcript starting in *PHO84* and extending into *YML122C* (Fig 2.5E). Hence, these data indicate that CK2 phosphorylation sites in Spt6 are required for the repression of antisense transcription in yeast cells.

2.5.8. CK2 phosphorylation sites in Spt6 are required for global repression of transcription from intragenic cryptic promoters

Spt6 is involved in the repression of global spurious transcription from cryptic promoter (Cheung et al., 2008). As shown in Figure 2.4 mutations of CK2 phosphorylation sites leads to the derepression of *FLO8* cryptic promoter suggesting that CK2 regulation of Spt6 may be involved in global control of sense cryptic transcripts level. To analyze the global role of CK2 regulation on cryptic transcripts, we measured the 3'/5' ratios in the *spt6 7S-A* mutant for all genes and compared them to that of wild-type cells. In *spt6 7S-A*, we found 621 genes with increased ratio suggesting that CK2 phosphorylation sites play an important role in the repression of cryptic transcription. These data are reproducible as attested by the correlation shown in Figure 2.S5. To validate these results, we measured the 3'/5' ratio by RT-qPCR at 3 genes, *FLO8*, *SPO23* and *MAL33*, exhibiting 3' enrichment in *spt6 7S-A* mutant RNA-seq signal (Fig 2.5F). *FLO8* is used as positive 3' enrichment control, *PMAI*

and *FKS1* as negative controls. Interestingly, as predicted by our RNA-seq analyses, *spt6 7S-A* mutation is associated with an increase of 3'/5' transcripts ratio at *FLO8*, *SPO23* and *MAL33* (Fig 2.5F). This effect is not observed in the negative controls *PMA1* and *FKS1* confirming that CK2 regulation of Spt6 controls the cryptic transcripts level at several genes identified by our analyses. Moreover, our RNA-seq 3'/5' ratios data also predicted the existence of cryptic transcripts produced from within *DDC1* 3' end but not in *SPB4* 3' end region. This was surprising because *SPB4* is a common model gene used in several studies of cryptic transcription and has been found to be affected in *ck2^{ts}* cells (Cheung et al., 2008). To further confirm our analyses, we probed the transcripts of *DDC1* and *SPB4* by Northern blot (Fig 2.5G). We observed clear bands indicating short transcripts initiated from 3' end cryptic promoters of *FLO8* and *DDC1*, but not for *SPB4* as predicted by our analyses. Therefore, these data suggest significant, but not complete, overlap between *ck2^{ts}* and *spt6 7S-A* RNA-seq data sets. Together our observations indicate that CK2 phosphorylation of Spt6 is required for the repression of spurious transcription from cryptic promoters located within the coding regions of genes.

2.5.9. Spt6 phosphorylation mutants regulate cryptic sense and antisense transcription at promoters that are also affected by CK2

As suggested by our Northern blot experiments there are overlaps between *ck2^{ts}* and *spt6 7S-A* but also some differences as shown for *SPB4*. We wanted to address this question globally and know if the mutation of Spt6 phosphorylation sites affects cryptic sense or antisense transcription at the same sites as CK2. We first compared *ck2^{ts}* and *spt6 7S-A* RNA-seq data sets for antisense transcripts and found positive and significant correlation between the two datasets (Fig 2.5I). Interestingly, we also observed the same type of relation between the two sets of data regarding the cryptic transcripts identified by the 3'/5' ratio (Fig 2.5H). Furthermore, as indicated by the Venn diagrams, we observed a high level of shared targets between *ck2^{ts}* and *spt6 7S-A* both for antisense and sense cryptic transcripts that are affected in these mutants. This overlap is almost four times higher than what would be expected by chance (Fig 2.5H and I). Remarkably, 80% (427 out 544) of the

genes showing an increase of antisense transcription in *spt6 7S-A* produce also higher antisense transcripts in *ck2^{ts}* (Fig 2.5I). Together, these data establish a link between Spt6 phosphorylation and the global regulation of transcription accuracy by CK2. However, it must be noted that the group of CK2 genes producing pervasive antisense transcripts extends well beyond those affected in *spt6 7S-A*. This suggest that, in addition to CK2-Spt6 pathway, this kinase may regulate additional sites independently of Spt6.

2.5.10. CK2 phosphorylation sites are required for the stability of Spt6

The essential kinase CK2 regulates transcription accuracy possibly by modulating the activity of chromatin factors involved in the re-setting of the chromatin structure in the path of transcription. We have found that CK2 interacts and phosphorylates Spt6 which plays a major role in the refolding of nucleosomes in the body of genes. Our global data indicate that CK2 represses spurious transcription at many genes that are also affected by the loss of its phosphorylation sites in Spt6. These observations suggest that CK2 may influence, at least in part, the accuracy of transcription by phosphorylating Spt6 and thereby modulating its activity. Interestingly, studying the effect of CK2 on Spt6/Iws1 complex, we observed that the level of the complex is significantly dependent on CK2 phosphorylation of Spt6 and not Iws1 *in vitro* (data not shown). This effect is not observed *in vivo* (data not shown). However, we observed that CK2 depletion has a significant effect on total Spt6 protein level as indicated by western blots shown in Figure 2.6A. This finding suggests a mechanism involving CK2 that modifies the cellular level of Spt6. We tested this by assessing the level of Spt6 in *spt6 7S-A* cells. As shown in Figure 2.6B, mutation of CK2 phosphosites is clearly associated with a decreased level of Spt6. Interestingly, reducing the level of Spt6 just by 50% result in an impaired function as shown in Figure 2.S6A and previously reported (Clark-Adams and Winston, 1987; McCullough et al., 2015). The reduction of Spt6 level could be the consequence of either a defect in the production of the protein or an impaired stability. We tested this later possibility by asking whether CK2 phosphorylation sites contributes to Spt6 stability. For that Spt6 levels were analyzed in wild-type and CK2 phosphosites mutant *spt6 7S-A* cells grown in presence of

cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. As shown in Figure 2.6C and 2.S6B, Spt6 7S-A protein level decay was significantly faster than Spt6 WT decay. The half-life of Spt6 7S-A was around two hours while that of Spt6 WT is approximately four hours. Importantly, expressing a version of Spt6 mimicking CK2 phosphorylation stabilized the protein and no significant decay was observed after six hours of cycloheximide treatment. This result indicates that CK2 phosphorylation sites play a major role in the maintenance of normal Spt6 levels in the cells.

2.5.11. Restoring Spt6 cellular level in CK2 depleted cells suppresses new histone H3 incorporation and spurious transcription from *FLO8* cryptic promoter

Our later findings regarding Spt6 stability bring about an interesting possibility involving CK2 regulation of histone H3 dynamics. Indeed, one can assume that if CK2 regulation modulate histone H3 dynamics by maintaining Spt6 cellular levels then mimicking CK2 phosphorylation of Spt6 could affect this dynamic. To address this possibility, we analyzed the incorporation of new H3 in CK2 phosphosites mutants at the coding regions of several genes. The level of H3K56ac, a surrogate of new H3 incorporation, was assessed by ChIP assays in wild type or *ck2^{ts}* G1 arrested cells expressing either Spt6 WT or Spt6 7S-D (Fig 6.2D). Interestingly, when the *ck2^{ts}* cells express a wild type Spt6, the H3K56ac level is increased at the coding regions of active genes at both permissive and restrictive temperature. This shows higher replication-independent incorporation of newly synthesized H3 in *ck2^{ts}* and indicates that in these regions, H3/H4 tetramers that are disrupted by elongating RNAP II are not recovered. Instead, in these locations, new H3/H4 tetramers are used to reassemble nucleosomes. Importantly, when *ck2^{ts}* cells express a version of Spt6 that mimics CK2 phosphorylation, a clear suppression of new H3 incorporation is observed at the coding regions of active genes. This indicates that CK2 function in the regulation of replication-independent H3/H4 dynamics is mediated by the phosphorylation of Spt6 and suggests that stable level of this factor plays a key role in this process. To further study the effect of Spt6 phosphorylation state on CK2 chromatin function, we asked if the suppression of histone H3 incorporation observed in *ck2^{ts}* cells expressing a version

mimicking CK2 phosphorylation is associated with a change in the spurious transcription. To this end, we analyzed by Northern blot the transcripts of *FLO8* gene. As shown in Figure 2.6E, in restrictive conditions, short transcripts are clearly observed in *ck2^{ts}* cells expressing Spt6 WT or Spt6 7S-A. Interestingly, *ck2^{ts}* cells expressing Spt6 7S-D display significantly lower level of *FLO8* short transcripts indicating that stable levels of Spt6 suppress spurious transcription from cryptic promoters in cells that are depleted in CK2 activity. Together, our findings demonstrate that CK2 function in suppression of spurious transcription is at least in part dependent on the regulation of Spt6 stability through its direct phosphorylation.

2.5.12. Phosphorylation of Spt6 by CK2 is important for the efficient transcriptional response to environmental signals and stresses

CK2 has a widespread role in chromatin dynamics and the control of transcription accuracy without impacting transcript levels of most protein-encoding genes. Indeed, in standard conditions used in our study, the important production of spurious sense and antisense transcripts in CK2 depleted cells has only limited effects on gene expression. This surprising observation is however not restricted to CK2 and many chromatin modifiers have limited impact on gene expression (Weiner et al., 2012). Interestingly, elegant studies showed that chromatin regulators have greater effect on the dynamics of gene expression than on the steady state transcription (Weiner et al., 2012). Thus, it is possible that similar to chromatin regulators, CK2 would modify the dynamics of transcriptional response. To test this, we first asked whether CK2 has a role in the dynamics of galactose induction at galactose responsive genes. In Figure 2.7A, a time-course of Rpb1 recruitment to *GAL2* gene is shown in both wild type and *ck2^{ts}* at permissive and restrictive temperature. Interestingly, at both temperatures we observed a clear reduction of Rpb1 recruitment at *GAL2* while no such effect was observed at the constitutive gene *PMA1*. This defect was associated with a clear reduction of the *GAL2* mRNA production indicating that CK2 affects the cellular response to carbon source shift (Fig 2.7B). Next, we wanted to know if CK2 phosphorylation sites in Spt6 are important for Rpb1 recruitment and *GAL2*

transcriptional induction. Importantly, similar to *ck2^{ts}* mutant, the recruitment of Rpb1 and the induction of *GAL2* induction are both impaired in *spt6 7S-A* (Fig 2.7C and D). We further tested other transcriptional responses as histidine starvation by treating WT or mutant cells with 3-aminotriazole (3AT), a competitive inhibitor of His3. We observed that both *ck2^{ts}* and *spt6 7S-A* mutations affect significantly this response regarding mRNA levels of different metabolic gene activated by amino-acid starvation such as *HIS4*, *ARG1* and *ATRI* (Fig 2.7E). We conclude that CK2 and the its phosphorylation of Spt6 are required for the dynamic adaptation of cells to environmental changes and stresses.

2.6. Discussion

Proper refolding of chromatin during the course of transcription is tightly regulated. Defects in chromatin refolding have been linked to spurious transcription from cryptic promoters within the coding regions of different genes (Cheung et al., 2008; Jeronimo et al., 2015; Shetty et al., 2017; Venkatesh et al., 2012). Cryptic transcription is a widespread phenomenon in yeast, with many genes displaying such aberrant event. Importantly, it has also been reported in mammals (Hainer et al., 2015; Xie et al., 2011). Different factors can suppress cryptic transcription, including histones, regulators of histone genes, chromatin remodeling factors, transcription elongation factors and histone chaperones (Cheung et al., 2008; Jeronimo et al., 2015; Smolle et al., 2012). CK2 subunits have been associated with some of these factors. Indeed, subunits of CK2 have been found to be associated with different factors that modulate chromatin structure during transcription elongation (Bedard et al., 2016; Gavin et al., 2002; Krogan et al., 2002). Previous studies suggested that CK2 may regulate chromatin structure (Barz, 2003; Basnet et al., 2014; Calvert et al., 2008). However, an exact mechanism of how such regulation operates remained largely elusive. Here we show, for the first time, clear and direct evidence of CK2 involvement in this process. Our data further support a physical and a functional link between CK2 and an essential HC indicating a specific role of CK2 in chromatin structure dynamics. Furthermore, we identified a potential mechanism of how CK2 regulates chromatin modulations associated with transcription elongation. By regulating this chromatin process,

CK2 contributes directly to the suppression of cryptic intragenic sense and antisense transcription.

2.6.1. CK2 controls the nature of nucleosomes in the 3'end of transcribed regions

During transcription elongation, nucleosomes are unfolded to allow the progression of the transcription machinery along DNA (Venkatesh and Workman, 2015). Upon RNAP II passage, nucleosomes are refolded back, mainly by mechanisms that preserves the histone H3/H4 tetramers. These mechanisms involve histone H3/H4 chaperones such as Spt2 and Spt6 (Chen et al., 2015; Ferrari and Strubin, 2015; Kato et al., 2013). In addition to nucleosomes refolding, histones are further modified by enzymes, including Set2, which incorporates methyl groups on lysine 36 of histone H3 (B. Li et al., 2007b). This modification is of great importance because it directs the deacetylation of histone H3/H4 tails and thereby stabilizes nucleosomes (B. Li et al., 2007b; Venkatesh et al., 2012).

Together, reassembly of nucleosomes and chemical modifications of histones are required for the repression of spurious transcription and for the focusing of RNAP II on real promoters that lead to the production of transcripts translated into proteins. Our data show a key role of CK2 in chromatin remodeling in 3'end of coding regions. First, we found that CK2 activity is required for the control of H3K56 acetylation level in transcribed regions of several genes (Fig 2.1A). Second, we showed that histone H3 exchange in coding regions, a surrogate of nucleosomes turnover in these locations (Rando and Winston, 2012), is also tightly and globally controlled by CK2 (Fig 2.1C). Third, the high level of histone H3 exchange we observed in CK2 depleted cells is specifically located in the 3'end regions of genes (Fig 2.1D). Thus, CK2 controls the nature of nucleosomes that are refolded back after the passage of RNAP II and this has important consequences. Indeed, a marked increase of replication-independent histone H3/H4 exchange means that those nucleosomes have different marks and may therefore display different properties. A high level of H3K56ac outside of S-phase indicates not only a higher histone H3/H4 turnover but also a higher general acetylation level of histone H3/H4 (B. Li et al., 2007b; Venkatesh et al., 2012). As discussed above, acetylation of H3/H4 in coding region has a major impact on the role of the chromatin structure as barrier against RNAP II wrongful association in these

locations. Our work clearly shows that CK2 is required for the control of H3K56ac levels in coding regions and may influence indirectly other histone acetylation sites that could be important for the inhibition of cryptic promoters located within coding regions.

2.6.2. CK2-mediated phosphorylation of Spt6 modulates chromatin in transcribed regions

Several new observations made in this work point toward a direct regulation of one of the main histone chaperone involved in chromatin modulations during transcription elongation. Indeed, we found that Spt6 is phosphorylated on several residues by CK2 both *in vivo* and *in vitro* (Fig 2.3). These phosphosites have an important impact on the function of Spt6 and their mutation leads to defects in the suppression of Ty transcription (Fig 2.4). In addition, they are required for the control of H3K56ac levels and the recycling of H3/H4 tetramers in coding regions. Consequently, the Spt6 version mutated in CK2 phosphosites cannot achieve the repression of spurious transcription, as shown by reporter assay, Northern blot and RNA-seq data (Fig 2.4 and 2.5). Importantly, we demonstrated that mimicking CK2 phosphorylation results in clear rescue of *ck2^{ts}* phenotypes on both histone H3 dynamics and spurious transcription (Fig 2.6C and D). Thus, we feel confident that an important part of CK2 regulation proceeds through Spt6 phosphorylation. This is especially the case for histone H3 dynamics, given the fact that the expression of an Spt6 version mimicking CK2 phosphorylation in *ck2^{ts}* mutants leads to a complete repression of histone H3K56ac increased incorporation in the tested coding regions (Fig 2.6D). However, it is also clear that CK2 control of cryptic sense and antisense transcription extends beyond the role of Spt6. Indeed, despite good overlap between *ck2^{ts}* and *spt6 7S-A* data sets with regards to genes producing intragenic or antisense transcripts, differences do exist. This is well illustrated by the comparison of *ck2^{ts}* and *spt6 7S-A* genes that were affected for antisense transcripts. We observed that almost 80% of genes affected in *spt6 7S-A* also produce antisense transcripts in *ck2^{ts}*. However, CK2 mutant affects many more genes and only 32% are in common with *spt6 7S-A*. Several possibilities could explain these observations. In our experimental conditions, *ck2^{ts}* could simply have indirect effects that would result in

more drastic phenotypes. Alternatively, CK2 could regulate different factor(s) that would modulate directly the initiation from different cryptic sense or antisense promoters. Interestingly, CK2 has been directly linked with PAF elongation complex and H2B ubiquitylation (Basnet et al., 2014; Bedard et al., 2016) both of which were associated with spurious transcription and chromatin reassembly (Chu et al., 2007; Fleming et al., 2008). The existence of such alternative pathway is supported by the partial suppression of CK2 spurious transcription when Spt6 7S-D is expressed. In anyways, CK2 regulates directly Spt6 function by maintaining its cellular levels. This has direct consequences on histone H3/H4 dynamics in coding region and regulates thereby transcription accuracy.

2.6.3. CK2 may help RNAP II to focus on real promoters to allow optimal cell response to environmental challenges

In cells depleted of CK2 activity, we measured high levels of cryptic sense and antisense transcripts (Fig 2.2). It is likely that this spurious transcription would have a major impact on *bona fide* genes transcription. Indeed, an increasing number of studies in various organisms show that non-coding RNA and their transcription directly and indirectly regulate the transcription of genes (Camblong et al., 2009; Lenstra et al., 2015; Martens et al., 2005; Wilusz et al., 2009). Our data clearly discard such global effect and only minor consequences were observed on steady state levels (Fig 2.2C). However, one could expect that transcription of cryptic promoter driving either sense or antisense transcription would impact and compete with the normal canonical promoter. We assessed this possibility by analyzing the link between changes in the transcription of *bona fide* genes and the presence of spurious transcription in these genes. Unfortunately, we did not observe a significant correlation between the normal transcript variation and production of spurious transcription (data not shown). Importantly, this is consistent with previous observations made on *spt6-1004* mutant cells in which massive spurious transcription has been observed (Cheung et al., 2008; Uwimana et al., 2017). In this mutant, no significant correlation between spurious transcription and transcription from canonical promoters has been reported (Uwimana et al., 2017). It was proposed that absence of obvious link may be because *spt6-1004* has drastic effects on chromatin structure including massive nucleosomes loss (Ivanovska et al.,

2011). Importantly, in our experimental conditions, no such effect has been observed in CK2 depleted cells and histone H3 level taken as an assessment of nucleosomes occupancy was not changed (data not shown). Thus, in the light of our data, it seems unlikely that mutant with less drastic effect would allow us to uncover or analyze better a potential relationship between spurious and canonical transcription. Hence, the question of the spurious transcription effect on the *bona fide* gene expression remains unanswered. Two possibilities explaining the transcriptional role of CK2 may be discussed. First, cryptic transcription could have no impact on gene expression. This would be consistent with many observations regarding the phenotypes of mutants that produce spurious transcripts without a significant outcome on transcription from regular promoters. Indeed, mutants of the HCs Spt2 or the methyltransferase Set2 are associated with cryptic transcription that has virtually no impact on their growth fitness or even global gene expression (Nourani et al., 2006; Venkatesh et al., 2016). However, it is important to note that despite their importance, many chromatin factors mutants have mild effects on global gene expression. Presumably, this is due to homeostatic mechanisms that compensate for the loss of chromatin regulators (Weiner et al., 2012).

Interestingly, looking at model genes, such as *PHO5*, suggest a second possibility that may explain the potential transcription role of CK2. Indeed, in steady state standard conditions, *PHO5* transcription is not generally affected by the loss of many chromatin factors. This is however not the case when cells are challenged to produce rapidly the Pho5 alkaline phosphatase (Korber et al., 2006; Williams et al., 2008). Therefore, in the case of CK2, we reasoned that CK2 repression of spurious transcription may be important for the response to environmental challenges. As shown in our study, all stresses conditions tested in *ck2^{ts}* mutant led to the observation of a clear defect in the transcriptional response (Fig 2.7). Moreover, this was also observed in the Spt6 phosphosite mutant (Fig 2.7). Our observation is consistent with elegant global studies showing that chromatin factors have only mild effects on steady state transcription but are severely impaired in transcriptional stress response (Weiner et al., 2012). In anyways, our study shows a new role of CK2 in the regulation of histone H3/H4 dynamics through the phosphorylation of the HC Spt6. We propose a mechanism (see model Fig 2.8) where CK2 phosphorylates the Spt6 N-terminal domain and this modification stabilize Spt6. Consequently, this HC recycles H3/H4

tetramers and nucleosomes are adequately refolded back. Finally, we suggest that CK2 modulates other substrate that collaborate to the inhibition of spurious transcription. Future studies focused on these factors should give us a full picture on how this conserved kinase controls the accuracy of transcription.

2.7. Figures

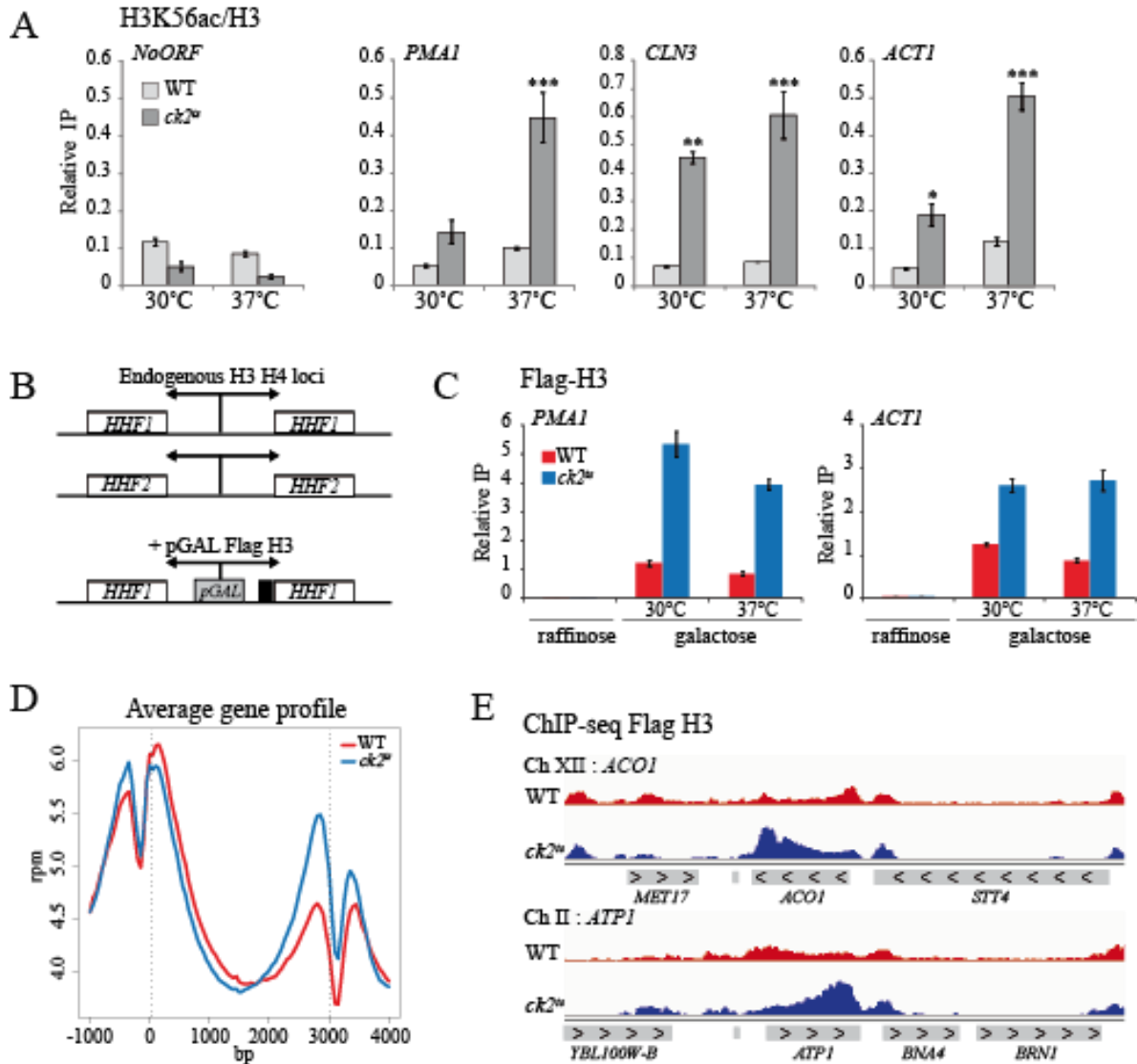


Figure 2.1 : Histone H3 turnover is increased in *ck2^{ts}* mutant at coding regions

A- ChIPs assays assessing the H3K56ac level in WT and *ck2^{ts}* mutant cells. The cells were arrested in G1, grown after that for 2h at 30°C or 37°C and then fixed with formaldehyde. The values shown represent H3K56ac levels relative to histone H3 occupancy. Chromatin immunoprecipitation was performed using total H3 or acetylated H3K56 antibodies, and analysed by qPCR at *PMA1*, *CLN3* and *ACT1* genes and at control non-transcribed region of chromosome V, *NoORF*. B- Schematic representation of Flag-H3 inducible construction. A galactose-inducible form of H3 fused to Flag

tag is coexpressed with histone H4 and inserted in *URA3* locus. C- ChIP experiment of newly synthesized Flag-H3 in WT and *ck2^{ts}* mutant in G1 arrested cells, analysed by qPCR at *PMA1* and *ACT1*. Cells were grown at 30°C in YP-Raffinose, arrested in G1, and then Galactose was added to induce Flag-H3 synthesis for 1h at 30°C or 37°C. D- Metagene analysis of ChIP-seq enrichment of newly synthesized Flag-H3 in WT and *ck2^{ts}* strains over transcribed regions aligned to the TSS. E- Snap shot of ChIP-seq enrichment values of Flag-H3 over 2 genomic regions of chromosomes XII and II illustrating increased Flag-H3 incorporation at *ACO1* and *ATP1* genes respectively.

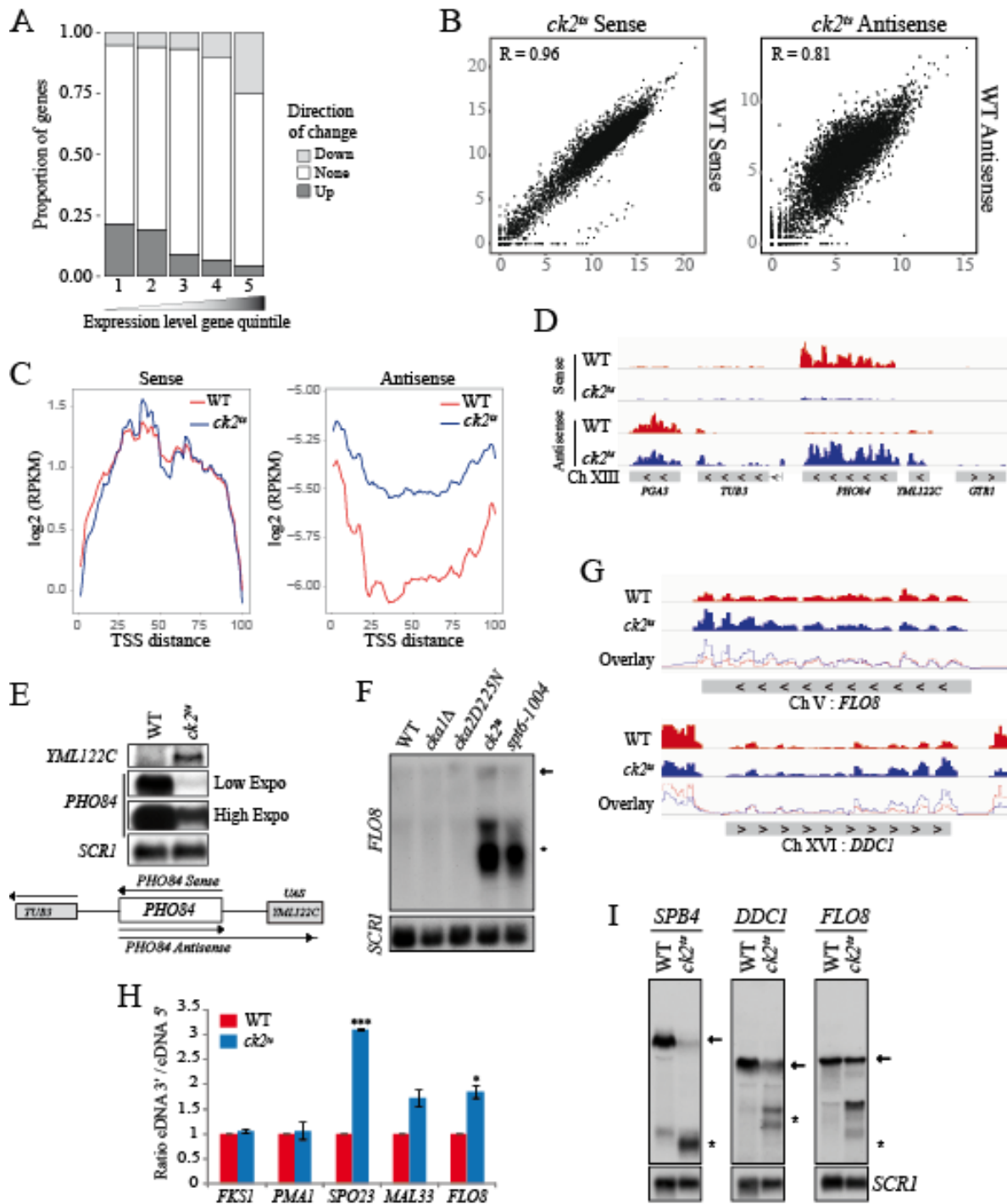


Figure 2.2 : CK2 regulates transcriptional accuracy

A- A representation of relative variation of genes transcripts in *ck2^{ts}* according to quintiles of gene expression in WT. A portion of variable genes is indicated in each expression quintile for 2-fold downregulated genes (light grey) and 2-fold up-regulated genes (dark grey). B- Sense and antisense \log_2 RPKM scores (respectively left panel and right panel) are plotted for each transcription unit for

ck2^{ts} versus WT, with the indicated *R* value corresponding to the Pearson correlation. C- Metagene analysis of the WT and *ck2^{ts}* *log*₂ RNA-seq signals on the sense (left panel) and antisense (right panel) strands aligned to the transcription start site (TSS). D- Snap shot of RNA-seq data at *PHO84* locus on chromosome XIII on sense and antisense strands for WT (red) and *ck2^{ts}* (blue) strains. E- Validation of antisense transcription RNA-Seq data by Northern Blot at *PHO84*. Total RNA of indicated strains was analysed by Northern Blot with a specific probe of *PHO84* to identify sense transcript, and with a specific probe of *YML122C* to identify antisense transcript as indicated on the map of *PHO84* locus. F- Northern blot analysis of WT, *cka1Δ*, *cka2D225N*, *ck2^{ts}* and *spt6-1004* strains at *FLO8* locus. RNA was isolated from cells grown at 30 °C and shifted to 37 °C for 2 hours. The probe for the northern analysis was generated against 3'-end of *FLO8*, and *SCR1* was used as a loading control. The arrow indicates full-length *FLO8* RNA transcripts, and the asterisk indicates *FLO8* short transcripts resulting from cryptic initiation. G- Snap shot of RNA-seq sense signal at *FLO8* and *DDC1* genes. The overlay of WT and *ck2^{ts}* signals illustrate 3' RNA enrichment in *ck2^{ts}* mutants. H- Validation of the RNA-seq data for *FKS1*, *PMA1*, *SPO23*, *MAL33* and *FLO8* by RT-qPCR. Gene expression was measured in the 5' and 3' regions of each gene and the 3'/5' ratio was used as a measure of cryptic sense transcription. RT-qPCR experiments were done in triplicates. (*) *P*-value < 0.05; (***) *P*-value < 0.001. I- Validation of 3' enrichment RNA-Seq data by Northern Blot analysis of cryptic transcription in *ck2^{ts}* mutants. Total RNA was isolated from cells after two hours of growth at 37°C and analysed by Northern Blot with probes specific for 3'-end of *FLO8*, *DDC1*, and *SPB4*. *SCR1* was used as a loading control. Arrows indicate full-length RNA transcripts, and asterisks indicate short transcripts.

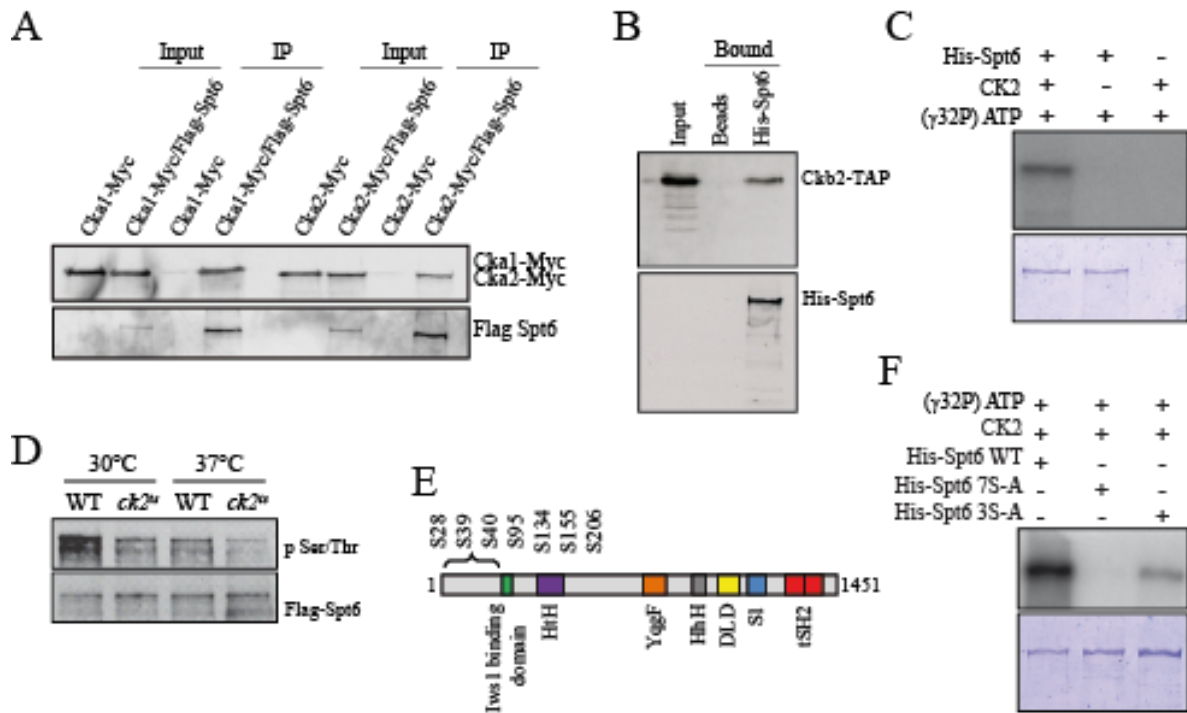


Figure 2.3 : CK2 Interacts with Spt6 and phosphorylates it *in vitro* and *in vivo*

A- Spt6 interacts with different subunits of CK2 *in vivo*. Flag-Spt6 was immunopurified from strains also expressing Cka1-Myc or Cka2-Myc. The purified samples were analyzed by western blot with antibodies against the Myc and Flag epitopes. A purification control was obtained using strains expressing untagged Spt6. B- Spt6 interacts directly with CK2 *in vitro*. A His pull-down assay was performed using equal amounts of Ckb2-TAP purified from yeast and recombinant 6xHis-Spt6. Ni-NTA agar beads alone served as a control. C- *In vitro* phosphorylation assay of recombinant 6xHis-Spt6 with CK2 kinase purified from yeast. D- Spt6 is phosphorylated *in vivo* in a CK2-dependent manner. Flag-Spt6 was immunopurified from WT and *ck2^{ts}* strains grown at 30°C or at 37°C for 2 hours. The purified samples were analyzed by western blot with antibodies against phosphoserine/phosphothreonine or Flag epitope. E- Schematic representation of various domains of Spt6: potential CK2 target sites (S28, S39, S40, S95, S134, S155, S206) are all found in the N-terminal region. F- *In vitro* phosphorylation assay of recombinant 6xHis-Spt6 WT, and non-phosphorylatable mutants (6xHis-Spt6 3S-A and 7S-A) using CK2 kinase purified from yeast.

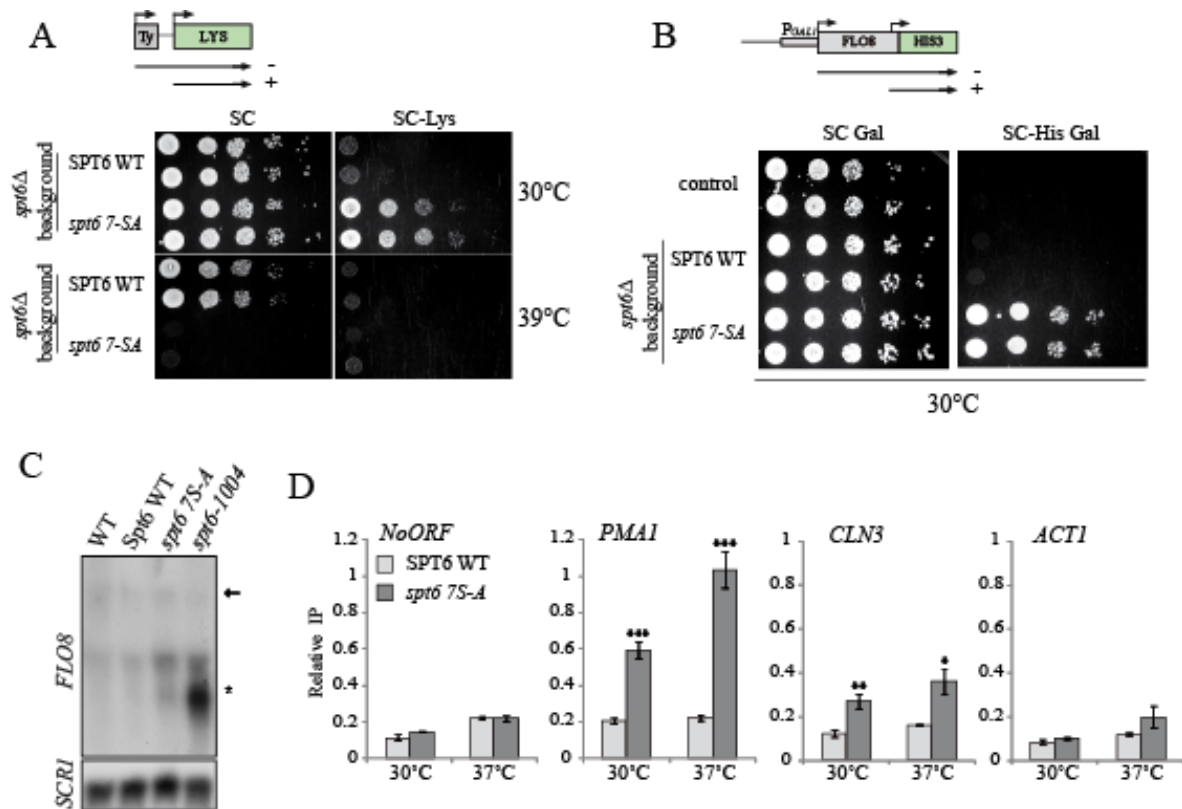


Figure 2.4 : Phosphorylation by CK2 regulates Spt6 chromatin function

A- Mutation of CK2 consensus residues of Spt6 into non-phosphorylatable alanine leads to thermosensitivity and *SPT* phenotype. SPT6 WT and *spt6 7S-A* strains containing the *Lys2-128δ* *SPT* reporter allele were serially diluted and spotted on synthetic complete (SC) or SC medium lacking lysine (SC-LYS) at 30°C or 39°C. The *spt6 7S-A* allele is thermosensitive and has an *spt*-phenotype. B- WT and *spt6Δ* strains expressing SPT6 WT or *spt6 7S-A* containing the *pGAL1-FLO8 HIS3* spurious transcription reporter were serially diluted and spotted on synthetic complete (SC) medium, or SC medium lacking histidine (SC-HIS) with Galactose as carbon sources. The *spt6 7S-A* allele growth in absence of histidine indicates intragenic cryptic initiation within *FLO8* coding region. C- Mutations of CK2 consensus residues in Spt6 result in cryptic transcription: cells expressing either SPT6 WT or *spt6 7S-A* non phosphorylatable mutant version were grown in YPD at the indicated temperatures. The *spt6-1004* strain was used as positive control. Total RNA was isolated and analyzed by Northern blot with a probe specific for 3'-end of *FLO8*. *SCR1* served as loading control. D- Replication-independent histone H3K56ac level is increased at coding regions in *spt6 7S-A* mutant. ChIPs assays of H3K56ac in G1-arrested cells expressing SPT6 WT or *spt6 7S-A*. The values shown represent H3K56ac levels relative to histone H3 occupancy. Strains were grown at 30°C, arrested in G1 with α -factor for approximately 2 hours and then incubated for an

additional hour at 30°C or 37°C. Chromatin immunoprecipitation was performed using total H3 or acetylated H3K56 antibodies, and analysed by qPCR at *PMA1*, *CLN3* and *ACT1* and at the control non-transcribed region *NoORF*.

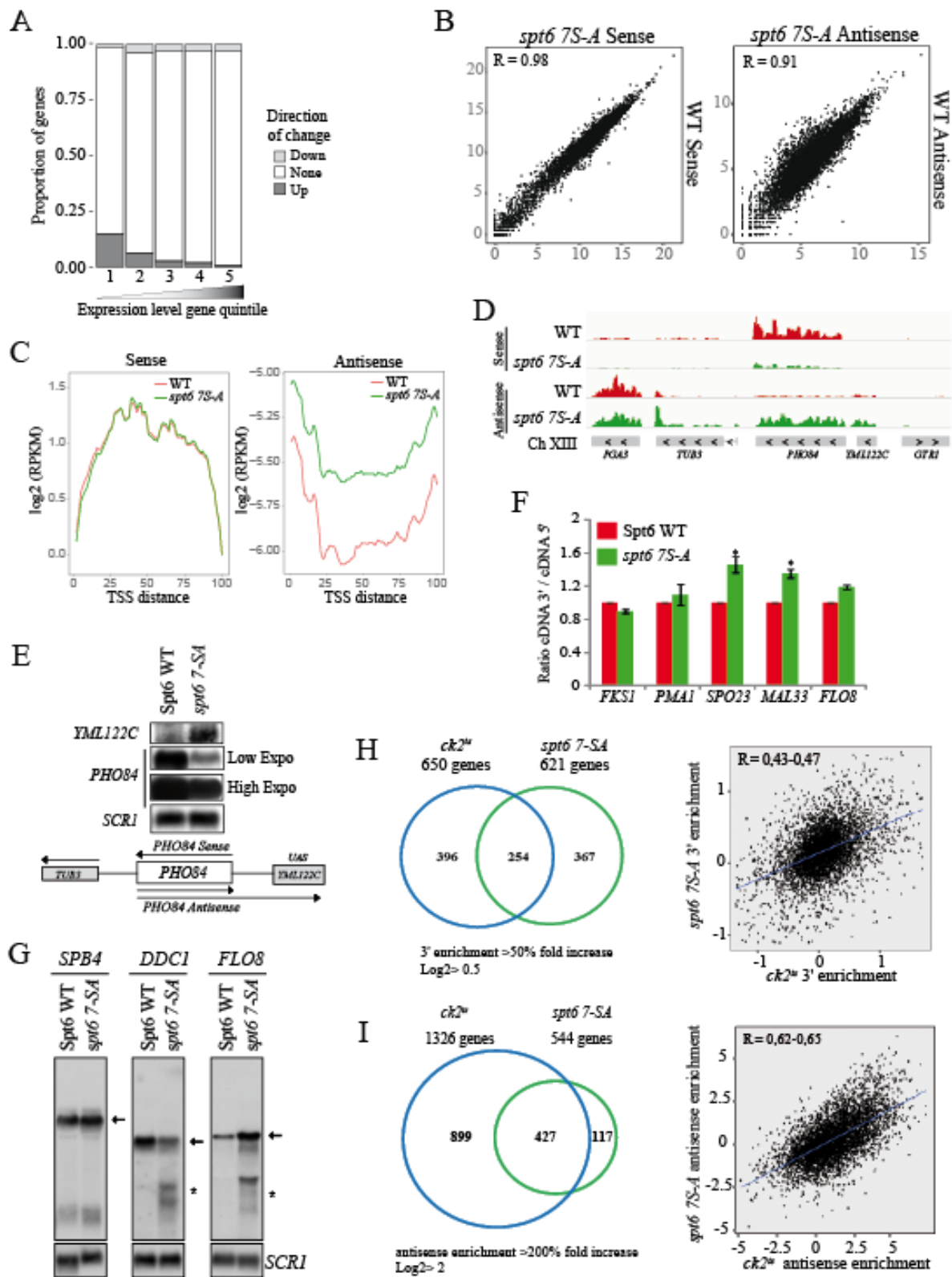


Figure 2.5 : Spt6 phosphorylation regulates cryptic intragenic and antisense transcription

A- A representation of genes that vary in *spt6 7S-A* according to quintiles their expression. The genes were grouped in each quantile according to their level of expression in WT cells. Those with a 2-fold increase are shown in dark grey. B- Sense and antisense \log_2 RPKM scores (left panel and right panel respectively) are plotted for each transcription unit for *spt6 7S-A* versus WT, with the indicated *R* value corresponding to the Pearson correlation. C- Metagene analysis of the WT and *spt6 7S-A* \log_2 RNA-seq signals on the sense (left panel) and antisense (right panel) strands aligned to the transcription start site (TSS). D- Snap shot of RNA-seq data at *PHO84* locus on chromosome XIII on sense and antisense strands for WT (red) and *spt6 7S-A* (green) strains. E- Validation of antisense transcription RNA-Seq data by Northern Blot at *PHO84*. Total RNA of indicated strains was analysed by Northern blot with a specific probe of *PHO84* to identify sense transcript, and with a specific probe of *YML122C* to identify antisense transcript as indicated on the map of *PHO84* locus. F- Validation of the RNA-seq data for *FKS1*, *PMA1*, *SPO23*, *MAL33* and *FLO8* by RT-qPCR. Gene expression was measured in the 5' and 3' regions of each gene and the 3'/5' ratio was used as a measure of cryptic transcription. RT-qPCR experiments were done at least in triplicates. G- Validation of 3' enrichment RNA-Seq data by Northern blot analysis of cryptic transcription in *spt6 7S-A* mutants. Total RNA was isolated from cells after 2 hours temperature shift from 30°C to 37°C and analysed by Northern Blot with probes specific for 3'-end of *FLO8*, *DDC1*, and *SPB4*. *SCR1* was used as a loading control. Arrows indicate full-length RNA transcripts, and asterisks indicate short transcripts. H- Venn diagram comparing the number of genes with predicted intragenic cryptic promoters in *ck2^{ts}* and *spt6 7S-A* mutants. I- Venn diagram comparing the number of genes with antisense enrichment in *ck2^{ts}* and *spt6 7S-A* mutants. The right panel is a plot of antisense enrichment RNA-seq results. Antisense/Sense ratio relative to WT for each gene in the *ck2^{ts}* was plotted against Antisense/Sense ratio relative to WT for each gene in the *spt6 7S-A*. *R* is the coefficient of correlation.

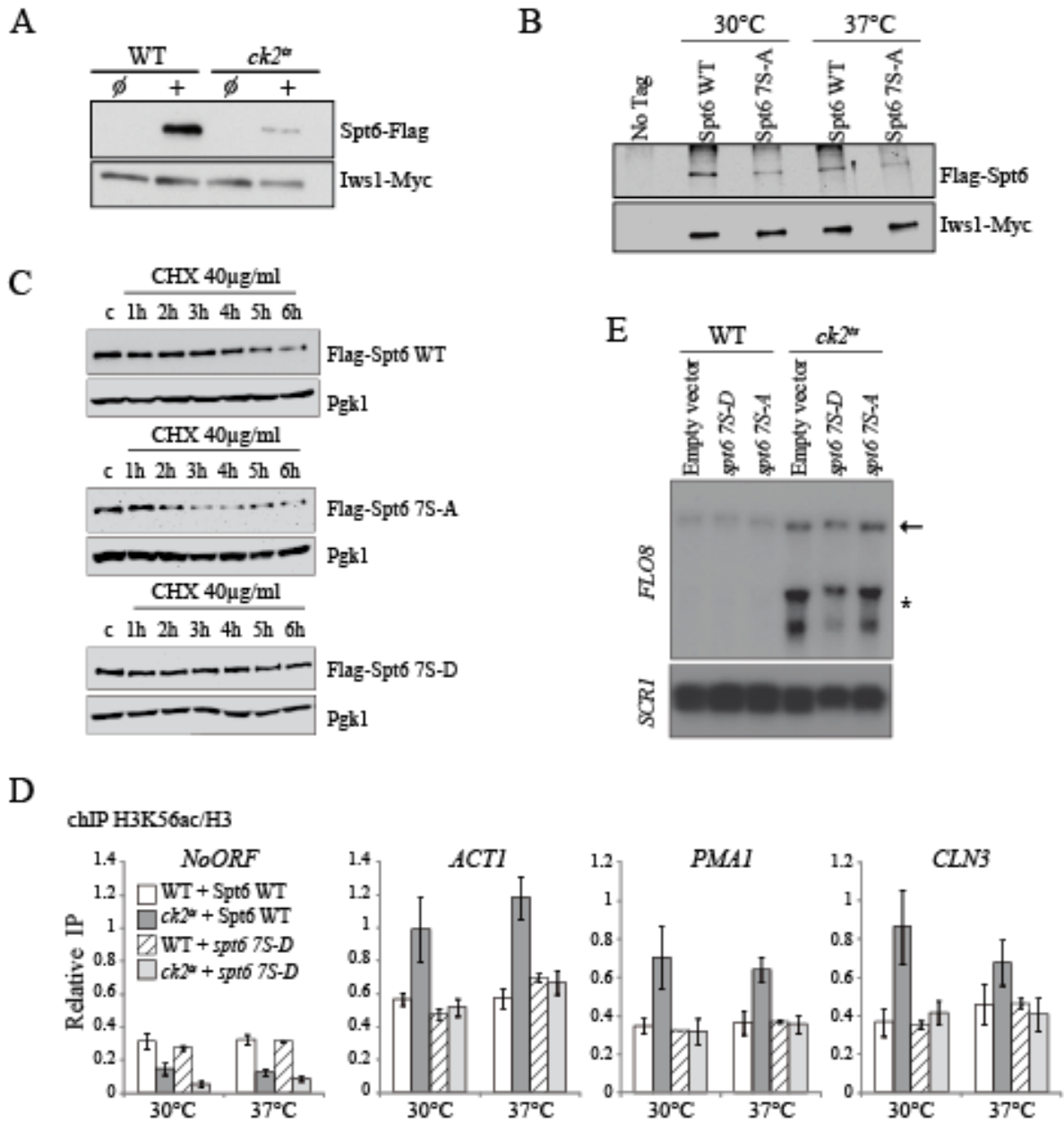


Figure 2.6 : CK2-depedant phosphorylation is critical for Spt6 stability and chromatin functions

A- Western Blot showing total Flag-Spt6 levels in WT and *ck2^{ts}* strains. Both strains are expressing Iws1-Myc and carrying either an empty vector or a plasmid expressing Flag-Spt6. Levels of Flag-Spt6 and Iws1-Myc proteins were measured using antibodies against Flag and Myc epitopes. B- Western Blot indicating chromatin Flag-Spt6 and Iws1-Myc levels. Total chromatin from *spt6Δ* strains expressing Iws1-Myc and carrying vectors encoding either Spt6 WT or 7S-A were analysed

by Western blot using antibodies against Flag and Myc epitopes. C- Phosphorylation state of Spt6 seems to influence Spt6 protein stability. Levels of Flag-Spt6 WT, Alanine (non phosphorylatable) and Acidic (phosphomimic) mutants were measured by western blotting using an anti-Flag antibody in cell lysates at the time points indicated following cycloheximide (CHX) treatment. Pgk1 is used as a loading control. The same amount of total protein was loaded per lane. D- Spt6 phosphomimic mutant *spt6 7S-D* suppresses the increased histone turnover phenotype in *ck2^{ts}* mutant. ChIPs assessing the H3K56ac level in G1-arrested WT and *ck2^{ts}* mutant strains expressing either SPT6 or Spt6 phosphomimic mutant *spt6 7S-D*. The values shown represent H3K56ac levels relative to histone H3 occupancy. E- Spt6 phosphomimic mutant *spt6 7S-D* suppresses the cryptic transcription phenotype at *FLO8* in *ck2^{ts}*. WT and *ck2^{ts}* strains were transformed with plasmids encoding *spt6 7S-D*, *spt6 7S-A*, or with empty vector. The strains were grown at 30°C and then shifted to 37°C for 2 hours. Total RNA was extracted and analyzed by Northern blot using a probe for *FLO8* 3' end. *SCR1* is as a loading control.

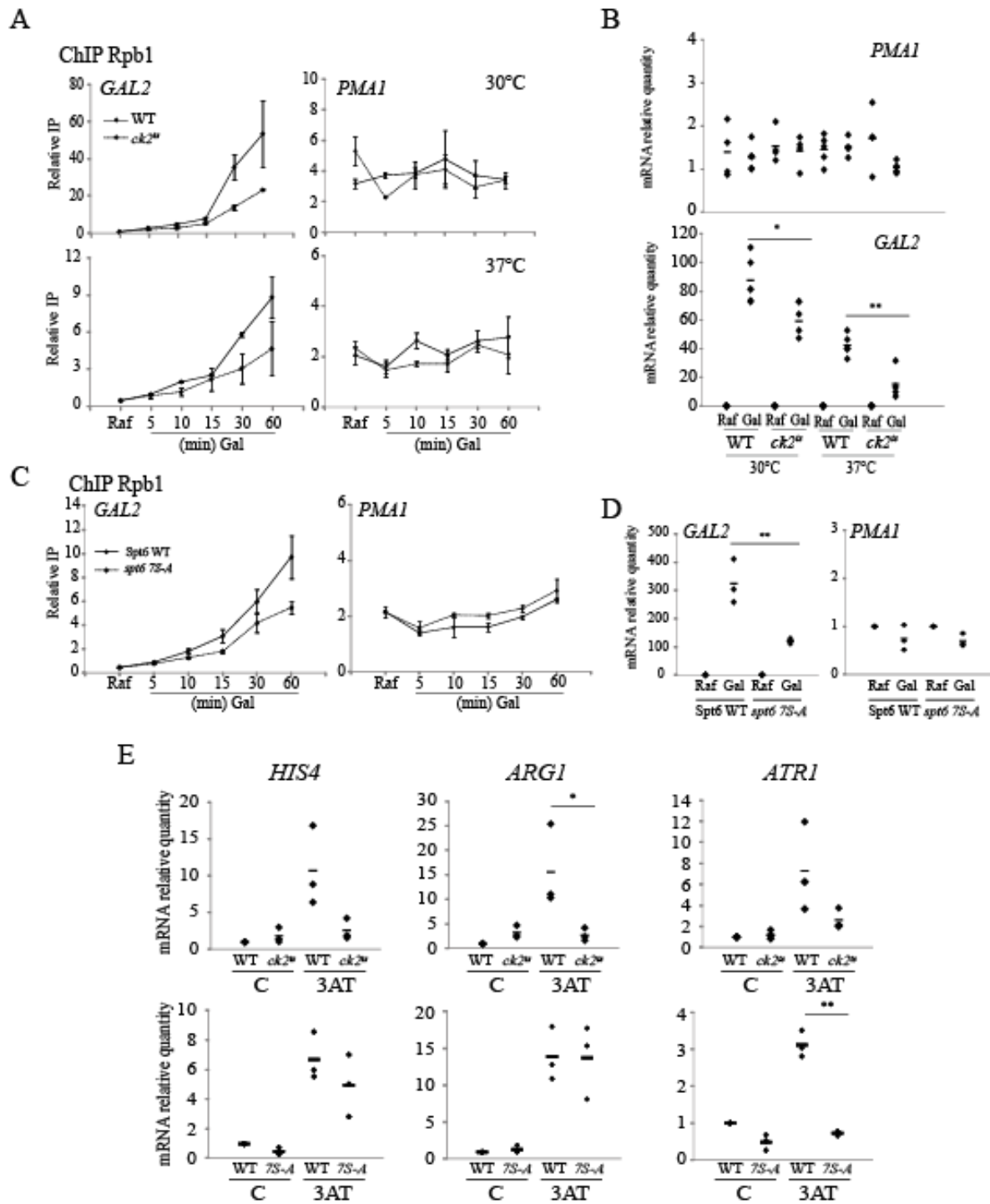


Figure 2.7 : CK2-Spt6 regulation pathway is required for transcriptional response dynamics to external stress signals

A- ChIP assays analysing Rpb1 recruitment in WT and *ck2^{ts}* strains at indicated time after galactose induction. The association of Rpb1 with the galactose inducible gene *GAL2* or with the *PMA1* constitutive gene was assessed at permissive (30°C) and non-permissive (37°C) temperature. B-

Transcripts levels of *GAL2* and *PMA1* upon galactose induction in WT and *ck2^{ts}*. Total RNAs extracted from the cells described in A were analysed by RT-qPCR. C- ChIP assays of Rpb1 recruitment in *spt6Δ* strains expressing either SPT6 or *spt6 7S-A* at the indicated time after galactose induction. The association of Rpb1 with the galactose inducible gene *GAL2* or with the *PMA1* constitutive gene was assessed at permissive (30°C) and non-permissive (37°C) temperature. D- Transcripts levels of *GAL2* and *PMA1* upon galactose induction in SPT6 or *spt6 7S-A*. Total RNAs extracted from the cells described in C were analysed by RT-qPCR. E- Histidine starvation response in *ck2^{ts}* and *spt6 7S-A*. WT, *ck2^{ts}* and *spt6Δ* strains expressing either SPT6 or *spt6 7S-A* were grown in SC-HIS medium, heat shocked at 37°C for 30 min and then treated with 40 mM 3-aminotriazole (3AT) for 1h to induce amino acid starvation response. Total RNA was extracted, used to produce cDNA and quantified by qPCR at *HIS4*, *ARG1* and *ATR1* genes. For all RT-qPCR, the relative level is the ratio of the indicated RNA to the *SCR1* transcript level. (*) *P*-value < 0.05; (**) *P*-value < 0.01; (***) *P*-value < 0.001.

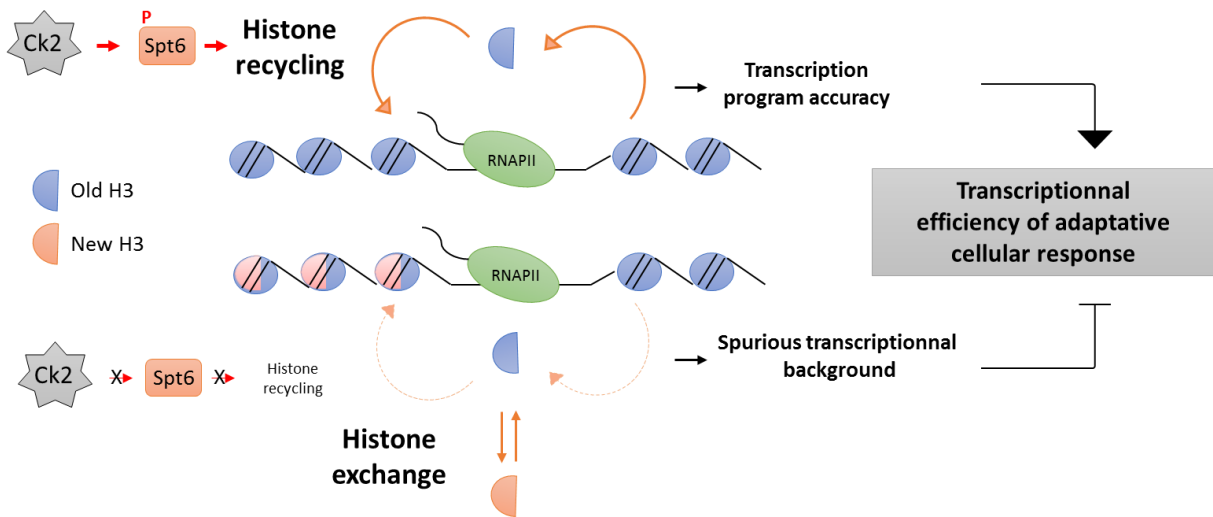


Figure 2.8 : Mechanism of chromatin regulation by CK2

2.8. Supplementary figures

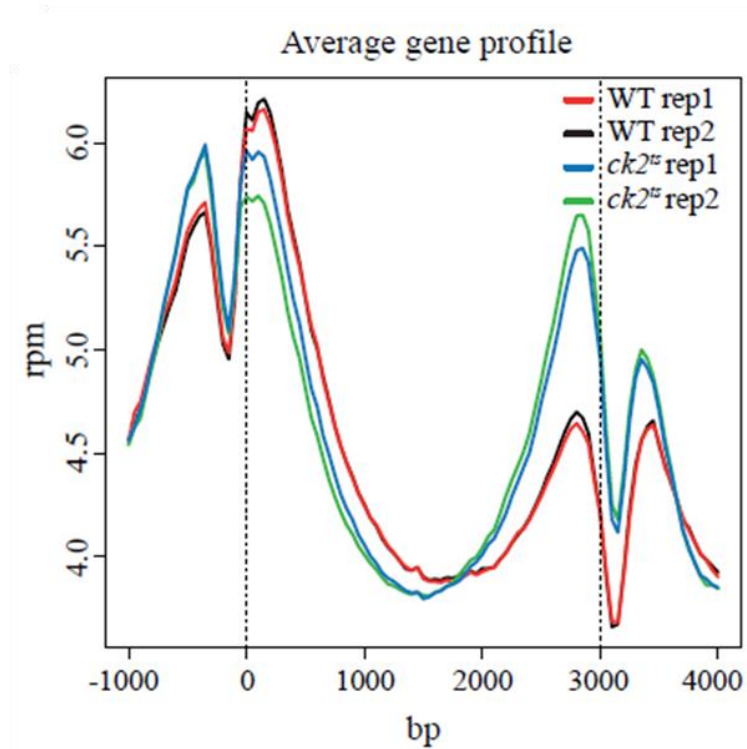


Figure 2.S1: CK2 regulates histone H3 turnover

Representation of Flag-H3 ChIP-seq metagene analyses for 2 WT (red and black) and *ck2^{ts}* (blue and green) independent replicates illustrating the high reproducibility of the two experiments.

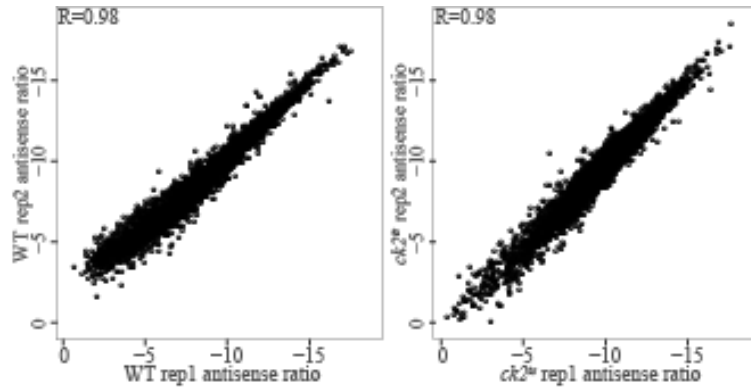


Figure 2.S2: Reproducibility of antisense ratio from RNA-seq analyses in WT and *ck2^Δ* mutant

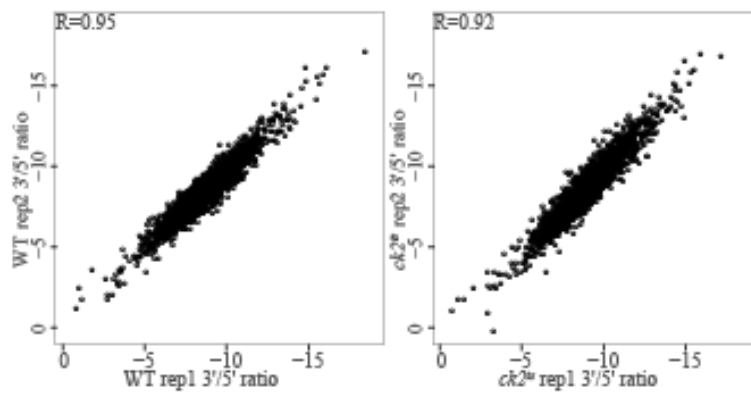


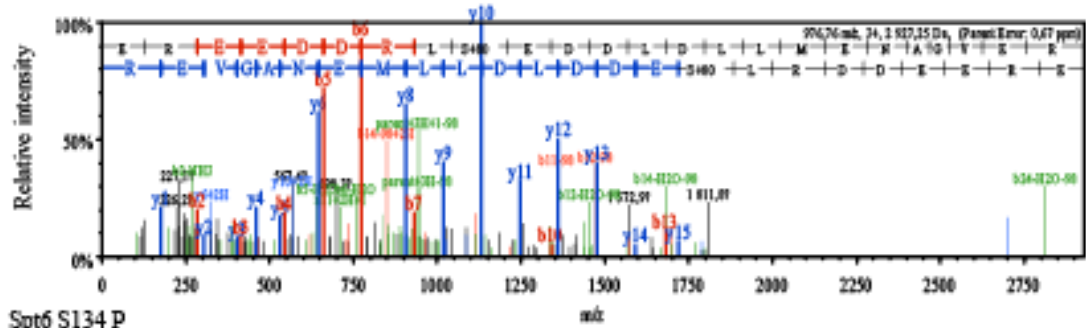
Figure 2.S3: Reproducibility of 3'/5' ratio from RNA-seq analyses in WT and *ck2^Δ* mutant

SPT6-YEAST Transcription elongation factor SPT6 (*Saccharomyces cerevisiae* (strain ATCC 204508/S288c))
 67 exclusive unique peptides, 79 exclusive unique spectra, 141 total spectral 705/1451 amino acids (49% coverage)

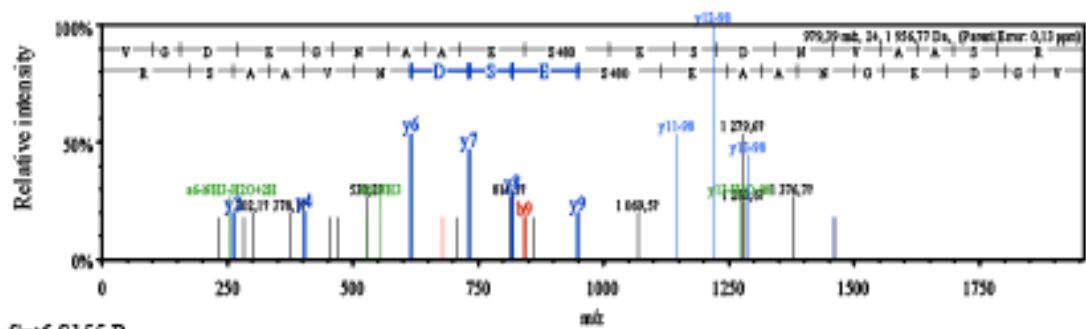
```

MEEVGQGLIV FRDEEIVVND NDTKAPSEE EREGDVFVDS EEDRIDEDD DEARKVQSGF IVDDDEBND FGTLSISKRR KHKREESRD DRDEECCLL
LMEHGVVET KASSSGRGFK ELKRVGDSGN AAEHESDVA ASRQCGYSKL EDFFEDSKE KESGLRNGH MEYGRDESDH ENRNRADNG GILDELDFI
EDGFDSDDD ETRQRIQEK KLLRQSIKQ PTQITGLSSD KIDNHYDIPG DGEVDYNALE IENKELNGH DNNEAREEHI DEBTGAIKST KQICLSLDIY
DLESDGQHM TEGDMIRKT DIPERYQLR AGITDYGMS SEDQELRNW IAKLISVGNV FDMYDLTEF KEAIGHAIKF IYKHELVVF IYAYRNYIS
SREKDGFLT EDGNDIVSL DIFPHSLVNK KDYVGRFYAR IALIDQIVTE YFNGQNTASI AKLMSLQDIY DYLEPKYANE INHWIHNHG KTGKQELNS
SYKFKASPL YQAVSDIGES AEDVGNKISS QRQIHFPVDH PSSKCPVEIE SILNANSGDL QVFTSNTKLA IDTVCKYSL ELSKNTKIR KVASDFSKYY
LADVVLTAAG EDIETGKSLY EDKVAIHRF PHEFRDFDV FLAQVAEEL NLLSVKLMS SQAQYIHLF QIALETTWTS DIATENSHFR KLAFFQANEK
IPQDISQVK DNLTHQDQL VAKTVRHKFN TKLDQAFFIP NVKDFKIKI LSLTQGGRF GADALIAVY SRKGFIRDY KIVCHFFDT NPKFDFDLY
NIIQSQPWA IGINGNPMT QNFYKRLQEV LBNQIVDSR GRTIPIIYVE DEVAIKYQMS ERAAQEFPNK PFLVKYCIAL ARMSHPLLE YALTSSEVR
SLSIHPHQL LSSRQLSMAL ETAFVDIVNL VSVVKNKATD NRYVASALY IEGFGKCAI DFLQSLQLH EFLARQQLI THWELKTF MSAGFLYIS
WNEKRCQYD LEHDQDSTR IHPEDYSLAT KVAADALEYD PDIATKSRQ GMSHFIEL REDQDRACKL ESKLSEYAR ELSKHTGLK LNLHTVILE
LDGFKELRN DFHPHQDRI FQSLTGESEK TFFKGLIIP VVERFWNDI ICTNSEVCK VVNAQHAGA QLRFPANEIY EIGTYFAKV IYIDYANITA
EVSLELDNVK QQVVFISYK DQSDINDAQE LEDAREEREL MGAARAKRT HRVINHPYFF PFRGQANDY LSKERGFV IROSGRDEH LVITWLEKD
LPHQIDIQEL EKHPLALGK VLVVDNQKYS DLDQIIVEYL QNVKLLNEM TSSEKFKSGT KEDAVKPIED YSRKVPKGV YPFLSHNDP GMYLMPKIN
ANSKLTWNV KLITNGYFLV NQNYPSVQL CMGFKTLLEK RSKSRMNY R
  
```

Spt6 S94 P



Spt6 S134 P



Spt6 S155 P

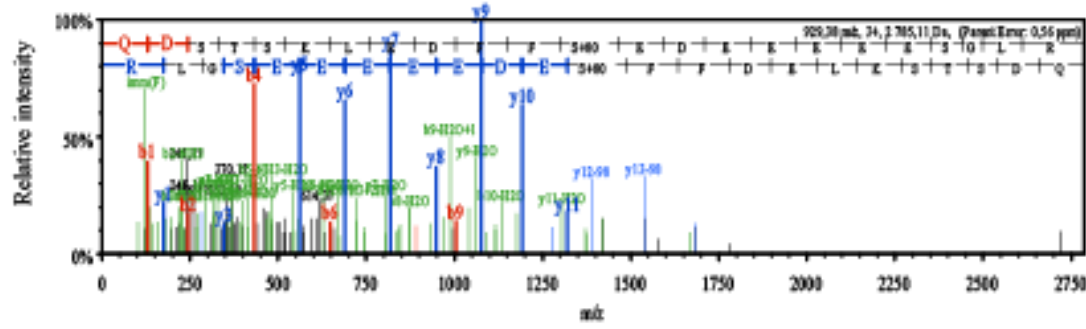


Figure 2.S4: Mass spectrometry analysis of *in vivo* purified Spt6

Complete sequence of Spt6 protein with peptide covered by mass spectrometry indicated in red. Phosphorylated residues are highlighted (S94, S134, S155) and an example of each phosphorylated peptide spectrum is presented.

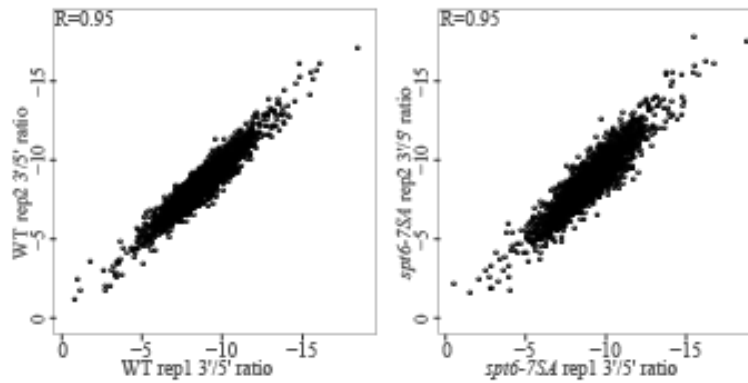


Figure 2.S5: Reproducibility of 3'/5' ratio from RNA-seq analyses in WT and *spt6* 7S-A mutant

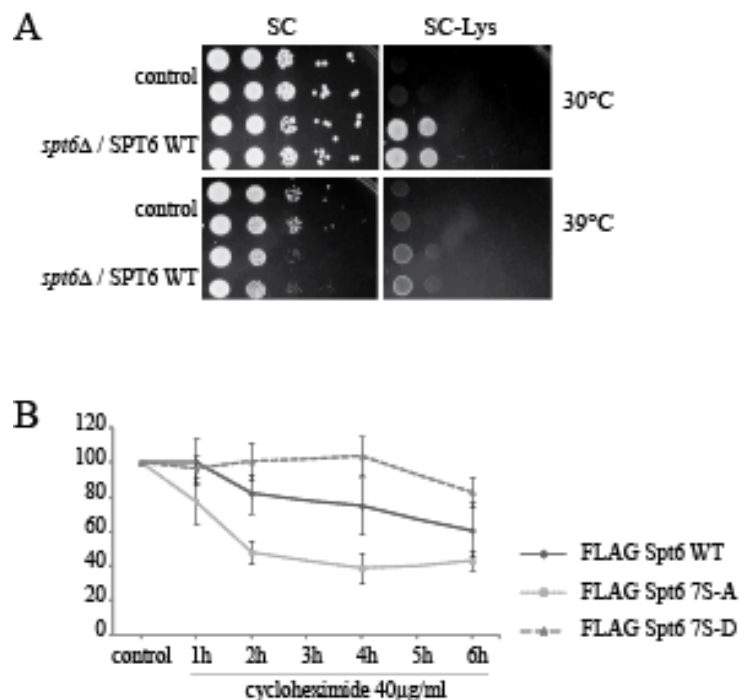


Figure 2.S6: Protein level is critical for Spt6 chromatin functions and regulated by CK2-dependent phosphorylation

A- WT/WT and *spt6*Δ/WT diploid strains containing the *lys2-128* *SPT* reporter were serially diluted and spotted on synthetic complete (SC) medium at 30°C or 39°C or SC medium lacking lysine (SC-LYS). The loss of lysine auxotrophy of *spt6*Δ/WT strain indicate a *spt*- phenotype. B- Graphs show at least three Western blots quantifications of the Flag-Spt6 WT, 7S-A and 7S-D bands normalized to P_{gk1} and illustrated by Figure 2.6C. The proteins were extracted from cells grown in medium containing cycloheximide for the indicated time.

2.9. References

- Albuquerque, C.P., Smolka, M.B., Payne, S.H., Bafna, V., Eng, J., Zhou, H., 2008. A Multidimensional Chromatography Technology for In-depth Phosphoproteome Analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 1389–1396. doi:10.1074/mcp.M700468-MCP200
- Anders, S., Huber, W., 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11, R106. doi:10.1186/gb-2010-11-10-r106
- Avvakumov, N., Nourani, A., Côté, J., 2011. Histone Chaperones: Modulators of Chromatin Marks. *Mol. Cell* 41, 502–514. doi:10.1016/j.molcel.2011.02.013
- Barz, T., 2003. Genome-wide expression screens indicate a global role for protein kinase CK2 in chromatin remodeling. *J. Cell Sci.* 116, 1563–1577. doi:10.1242/jcs.00352
- Basnet, H., Su, X.B., Tan, Y., Meisenhelder, J., Merkurjev, D., Ohgi, K.A., Hunter, T., Pillus, L., Rosenfeld, M.G., 2014. Tyrosine phosphorylation of histone H2A by CK2 regulates transcriptional elongation. *Nature* 516, 267–271. doi:10.1038/nature13736
- Bedard, L.G., Dronamraju, R., Kerschner, J.L., Hunter, G.O., Axley, E.D., Boyd, A.K., Strahl, B.D., Mosley, A.L., 2016. Quantitative Analysis of Dynamic Protein Interactions during Transcription Reveals a Role for Casein Kinase II in Polymerase-associated Factor (PAF) Complex Phosphorylation and Regulation of Histone H2B Monoubiquitylation. *J. Biol. Chem.* 291, 13410–20. doi:10.1074/jbc.M116.727735
- Bhat, W., Boutin, G., Rufiange, A., Nourani, A., 2013. Casein kinase 2 associates with the yeast chromatin reassembly factor Spt2/Sin1 to regulate its function in the repression of spurious transcription. *Mol. Cell. Biol.* 33, 4198–211. doi:10.1128/MCB.00525-13
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Bortvin, A., Winston, F., 1996. Evidence That Spt6p Controls Chromatin Structure by a Direct Interaction with Histones. *Science* (80-.). 272, 1473–1476.
- Bouazoune, K., Brehm, A., 2005. dMi-2 chromatin binding and remodeling activities are regulated by dCK2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 280, 41912–41920. doi:10.1074/jbc.M507084200
- Calvert, M.E.K., Keck, K.M., Ptak, C., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Pemberton, L.F., 2008. Phosphorylation by casein kinase 2 regulates Nap1 localization and function. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1313–1325. doi:10.1128/MCB.01035-07
- Camblong, J., Beyrouthy, N., Guffanti, E., Schlaepfer, G., Steinmetz, L.M., Stutz, F., 2009. Trans-acting antisense RNAs mediate transcriptional gene cosuppression in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* 23, 1534–1545. doi:10.1101/gad.522509
- Camblong, J., Iglesias, N., Fickentscher, C., Dieppois, G., Stutz, F., 2007. Antisense RNA Stabilization Induces Transcriptional Gene Silencing via Histone Deacetylation in *S. cerevisiae*. *Cell* 131, 706–717. doi:10.1016/j.cell.2007.09.014
- Carrozza, M.J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S.K., Lee, K.K., Shia, W.-J., Anderson,

- S., Yates, J., Washburn, M.P., Workman, J.L., 2005. Histone H3 Methylation by Set2 Directs Deacetylation of Coding Regions by Rpd3S to Suppress Spurious Intragenic Transcription. *Cell* 123, 581–592. doi:10.1016/j.cell.2005.10.023
- Chen, S., Rufiange, A., Huang, H., Rajashankar, K.R., Nourani, A., Patel, D.J., 2015. Structure-function studies of histone H3/H4 tetramer maintenance during transcription by chaperone Spt2. *Genes Dev.* 29, 1326–40. doi:10.1101/gad.261115.115
- Cheung, V., Chua, G., Batada, N.N., Landry, C.R., Michnick, S.W., Hughes, T.R., Winston, F., 2008. Chromatin- and transcription-related factors repress transcription from within coding regions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *PLoS Biol.* 6, 2550–2562. doi:10.1371/journal.pbio.0060277
- Chu, Y., Simic, R., Warner, M.H., Arndt, K.M., Prelich, G., 2007. Regulation of histone modification and cryptic transcription by the Bur1 and Paf1 complexes. *EMBO J.* 26, 4646–56. doi:10.1038/sj.emboj.7601887
- Clark-Adams, C., Winston, F., 1987. The *SPT6* gene is essential for growth and is required for delta-mediated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 679–686.
- Dastidar, E.G., Dayer, G., Holland, Z.M., Dorin-Semblat, D., Claes, A., Chene, A., Sharma, A., Hamelin, R., Moniatte, M., Lopez-Rubio, J.-J., Scherf, A., Doerig, C., 2012. Involvement of *Plasmodium falciparum* protein kinase CK2 in the chromatin assembly pathway. *BMC Biol.* 10, 5. doi:10.1186/1741-7007-10-5
- DeGennaro, C.M., Alver, B.H., Marguerat, S., Stepanova, E., Davis, C.P., Bahler, J., Park, P.J., Winston, F., 2013. Spt6 Regulates Intragenic and Antisense Transcription, Nucleosome Positioning, and Histone Modifications Genome-Wide in Fission Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 33, 4779–4792. doi:10.1128/MCB.01068-13
- Deplus, R., Blanchon, L., Rajavelu, A., Boukaba, A., Defrance, M., Luciani, J., Roth, F., Dedeurwaerder, S., Denis, H., Brinkman, A.B., Simmer, F., Müller, F., Bertin, B., Berdasco, M., Putmans, P., Calonne, E., Litchfield, D.W., De Launoit, Y., Jurkowski, T.P., Stunnenberg, H.G., Bock, C., Sotiriou, C., Fraga, M.F., Esteller, M., Jeltsch, A., Fuks, F., 2014. Regulation of DNA methylation patterns by CK2-mediated phosphorylation of Dnmt3a. *Cell Rep.* 8, 743–753. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.048
- Dion, M.F., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Friedman, N., Rando, O.J., 2007. Dynamics of Replication-Independent Histone Turnover in Budding Yeast. *Science* (80-). 315, 1405–1408. doi:10.1126/science.1134053
- Ferrari, P., Strubin, M., 2015. Uncoupling histone turnover from transcription-associated histone H3 modifications. *Nucleic Acids Res.* 43, 3972–3985. doi:10.1093/nar/gkv282
- Fleming, A.B., Kao, C.-F., Hillyer, C., Pikaart, M., Osley, M.A., 2008. H2B Ubiquitylation Plays a Role in Nucleosome Dynamics during Transcription Elongation. *Mol. Cell* 31, 57–66. doi:10.1016/j.molcel.2008.04.025
- Gavin, A.-C., Bösche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.-M., Cruciat, C.-M., Remor, M., Höfert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse,

B., Leutwein, C., Heurtier, M.-A., Copley, R.R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., Superti-Furga, G., 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141–147. doi:10.1038/415141a

Gaykalova, D.A., Kulaeva, O.I., Volokh, O., Shaytan, A.K., Hsieh, F.-K., Kirpichnikov, M.P., Sokolova, O.S., Studitsky, V.M., 2015. Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E5787–E5795. doi:10.1073/pnas.1508371112

Gérard, A., Ségéral, E., Naughtin, M., Abdouni, A., Charmeteau, B., Cheynier, R., Rain, J.-C., Emiliani, S., 2015. The Integrase Cofactor LEDGF/p75 Associates with Iws1 and Spt6 for Postintegration Silencing of HIV-1 Gene Expression in Latently Infected Cells. *Cell Host Microbe* 17, 107–117. doi:10.1016/j.chom.2014.12.002

Goldstein, A.L., McCusker, J.H., 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* - Goldstein - 1999 - *Yeast* - Wiley Online Library. *Yeast* 15, 1541–1553. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K

Gurard-Levin, Z.A., Quivy, J.-P., Almouzni, G., 2014. Histone Chaperones: Assisting Histone Traffic and Nucleosome Dynamics. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 487–517. doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035536

Hainer, S.J., Gu, W., Carone, B.R., Landry, B.D., Rando, O.J., Mello, C.C., Fazio, T.G., 2015. Suppression of pervasive noncoding transcription in embryonic stem cells by esBAF. *Genes Dev.* 29, 362–378. doi:10.1101/gad.253534.114

Hammond, C.M., Strømme, C.B., Huang, H., Patel, D.J., Groth, A., 2017. Histone chaperone networks shaping chromatin function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* doi:10.1038/nrm.2016.159

Ivanovska, I., Jacques, P.-É., Rando, O.J., Robert, F., Winston, F., 2011. Control of chromatin structure by spt6: different consequences in coding and regulatory regions. *Mol. Cell Biol.* 31, 531–541. doi:10.1128/MCB.01068-10

Jeronimo, C., Watanabe, S., Kaplan, C.D., Peterson, C.L., Robert, F., 2015. The Histone Chaperones FACT and Spt6 Restrict H2A.Z from Intragenic Locations. *Mol. Cell* 58, 1113–1123. doi:10.1016/j.molcel.2015.03.030

Kaplan, C.D., Laprade, L., Winston, F., 2003. Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. *Science* 301, 1096–9. doi:10.1126/science.1087374

Kato, H., Okazaki, K., Iida, T., Nakayama, J.-I., Murakami, Y., Urano, T., 2013. Spt6 prevents transcription-coupled loss of posttranslationally modified histone H3. *Sci. Rep.* 3, 2186. doi:10.1038/srep02186

Kireeva, M.L., Walter, W., Tchernajenko, V., Bondarenko, V., Kashlev, M., Studitsky, V.M., 2002. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription. *Mol. Cell* 9, 541–52.

Kitazono, A.A., Tobe, B.T.D., Kalton, H., Diamant, N., Kron, S.J., 2002. Marker-fusion PCR for one-step mutagenesis of essential genes in yeast. *Yeast* 19, 141–149. doi:10.1002/yea.806

- Korber, P., Barbaric, S., Luckenbach, T., Schmid, A., Schermer, U.J., Blaschke, D., Hörz, W., 2006. The histone chaperone Asf1 increases the rate of histone eviction at the yeast PHO5 and PHO8 promoters. *J. Biol. Chem.* 281, 5539–45. doi:10.1074/jbc.M513340200
- Kornberg, R.D., 1977. Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 931–54. doi:10.1146/annurev.bi.46.070177.004435
- Krogan, N.J., Kim, M., Ahn, S.H., Zhong, G., Kobor, M.S., Cagney, G., Emili, A., Shilatifard, A., Buratowski, S., Greenblatt, J.F., 2002. RNA Polymerase II Elongation Factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a Targeted Proteomics Approach. *Society* 22, 6979–6992. doi:10.1128/MCB.22.20.6979
- Kulaeva, O.I., Hsieh, F.-K., Chang, H.-W., Luse, D.S., Studitsky, V.M., 2013. Mechanism of transcription through a nucleosome by RNA polymerase II. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1829, 76–83. doi:10.1016/j.bbagr.2012.08.015
- Lenstra, T.L., Coulon, A., Chow, C.C., Larson, D.R., Lenstra, T.L., Coulon, A., Chow, C.C., Larson, D.R., 2015. Single-Molecule Imaging Reveals a Switch between Spurious and Functional ncRNA Transcription Article Single-Molecule Imaging Reveals a Switch between Spurious and Functional ncRNA Transcription. *Mol. Cell* 60, 597–610. doi:10.1016/j.molcel.2015.09.028
- Li, B., Gogol, M., Carey, M., Pattenden, S.G., Seidel, C., Workman, J.L., 2007. Infrequently transcribed long genes depend on the Set2/Rpd3S pathway for accurate transcription. *Genes Dev.* 21, 1422–30. doi:10.1101/gad.1539307
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324
- Li, X., Gerber, S.A., Rudner, A.D., Beausoleil, S.A., Haas, W., Villén, J., Elias, J.E., Gygi, S.P., 2007. Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.* 6, 1190–7. doi:10.1021/pr060559j
- Li, Y., Keller, D.M., Scott, J.D., Lu, H., 2005. CK2 phosphorylates SSRP1 and inhibits its DNA-binding activity. *J. Biol. Chem.* 280, 11869–11875. doi:10.1074/jbc.M413944200
- Lin, C.-H., Workman, J.L., 2011. Suppression of cryptic intragenic transcripts is required for embryonic stem cell self-renewal. *EMBO J.* 30, 1420–1421. doi:10.1038/emboj.2011.99
- Longtine, M.S., McKenzie, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., Pringle, J.R., 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953–961. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U
- Martens, J.A., Wu, P.Y.J., Winston, F., 2005. Regulation of an intergenic transcript controls adjacent gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 19, 2695–2704. doi:10.1101/gad.1367605
- McCullough, L., Connell, Z., Petersen, C., Formosa, T., 2015. The abundant histone chaperones Spt6 and FACT collaborate to assemble, inspect, and maintain chromatin structure in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 201, 1030–1045. doi:10.1534/genetics.115.180794
- Meggio, F., Pinna, L. a, 2003. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.*

17, 349–368. doi:10.1096/fj.02-0473rev

Nourani, A., Doyon, Y., Utle, R.T., Lane, W.S., Côté, J., Allard, P., 2001. Role of an ING1 Growth Regulator in Transcriptional Activation and Targeted Histone Acetylation by the NuA4 Complex. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7629–7640. doi:10.1128/MCB.21.22.7629

Nourani, A., Robert, F., Winston, F., 2006. Evidence that Spt2/Sin1, an HMG-like factor, plays roles in transcription elongation, chromatin structure, and genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1496–509. doi:10.1128/MCB.26.4.1496-1509.2006

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., Séraphin, B., 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218–229. doi:10.1006/meth.2001.1183

Rando, O.J., Winston, F., 2012. Chromatin and Transcription in Yeast. *Genetics* 190.

Rose, M.D., Novick, P., Thomas, J.H., Botstein, D., Fink, G.R., 1987. A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene* 60, 237–43.

Rufiange, A., Jacques, P.É., Bhat, W., Robert, F., 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. doi:10.1016/j.molcel.2007.07.011

Selth, L.A., Sigurdsson, S., Svejstrup, J.Q., 2010. Transcript Elongation by RNA Polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 271–293. doi:10.1146/annurev.biochem.78.062807.091425

Shetty, A., Kallgren, S.P., Demel, C., Maier, K.C., Spatt, D., Alver, B.H., Cramer, P., Park, P.J., Winston, F., 2017. Spt5 Plays Vital Roles in the Control of Sense and Antisense Transcription Elongation. *Mol. Cell* 66, 77–88.e5. doi:10.1016/j.molcel.2017.02.023

Sikorski, R.S., Hieter, P., 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19–27. doi:0378111995000377 [pii]

Smolle, M., Venkatesh, S., Gogol, M.M., Li, H., Zhang, Y., Florens, L., Washburn, M.P., Workman, J.L., 2012. Chromatin remodelers Isw1 and Chd1 maintain chromatin structure during transcription by preventing histone exchange. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 884–892. doi:10.1038/nsmb.2312

St-Denis, N.A., Litchfield, D.W., 2009. From birth to death: The role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1817–1829. doi:10.1007/s00018-009-9150-2

Studitsky, V.M., Walter, W., Kireeva, M., Kashlev, M., Felsenfeld, G., 2004. Chromatin remodeling by RNA polymerases. *Trends Biochem. Sci.* 29, 127–35. doi:10.1016/j.tibs.2004.01.003

Uwimana, N., Collin, P., Jeronimo, C., Haibe-Kains, B., Robert, F., 2017. Bidirectional terminators in *Saccharomyces cerevisiae* prevent cryptic transcription from invading neighboring genes. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkx242

van Bakel, H., Tsui, K., Gebbia, M., Mnaimneh, S., Hughes, T.R., Nislow, C., 2013. A

Compendium of Nucleosome and Transcript Profiles Reveals Determinants of Chromatin Architecture and Transcription. *PLoS Genet.* 9, e1003479. doi:10.1371/journal.pgen.1003479

Venkatesh, S., Li, H., Gogol, M.M., Workman, J.L., Workman, J.L., 2016. Selective suppression of antisense transcription by Set2-mediated H3K36 methylation. *Nat. Commun.* 7, 13610. doi:10.1038/ncomms13610

Venkatesh, S., Smolle, M., Li, H., Gogol, M.M., Saint, M., Kumar, S., Natarajan, K., Workman, J.L., 2012. Set2 methylation of histone H3 lysine 36 suppresses histone exchange on transcribed genes. *Nature* 489, 452–455. doi:10.1038/nature11326

Venkatesh, S., Workman, J.L., 2015. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 178–189. doi:10.1038/nrm3941

Weiner, A., Chen, H. V., Liu, C.L., Rahat, A., Klien, A., Soares, L., Gudipati, M., Pfeffner, J., Regev, A., Buratowski, S., Pleiss, J.A., Friedman, N., Rando, O.J., 2012. Systematic Dissection of Roles for Chromatin Regulators in a Yeast Stress Response. *PLoS Biol.* 10, e1001369. doi:10.1371/journal.pbio.1001369

Williams, S.K., Truong, D., Tyler, J.K., 2008. Acetylation in the globular core of histone H3 on lysine-56 promotes chromatin disassembly during transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 9000–9005. doi:10.1073/pnas.0800057105

Wilusz, J.E., Sunwoo, H., Spector, D.L., 2009. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev.* 23, 1494–504. doi:10.1101/gad.1800909

Winston, F., Dollard, C., Ricupero-Hovasse, S.L., 1995. Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* 11, 53–5. doi:10.1002/yea.320110107

Wu, S.Y., Lee, A.Y., Lai, H.T., Zhang, H., Chiang, C.M., 2013. Phospho switch triggers brd4 chromatin binding and activator recruitment for gene-specific targeting. *Mol. Cell* 49, 843–857. doi:10.1016/j.molcel.2012.12.006

Xie, L., Pelz, C., Wang, W., Bashar, A., Varlamova, O., Shadle, S., Impey, S., 2011. KDM5B regulates embryonic stem cell self-renewal and represses cryptic intragenic transcription. *EMBO J.* 30, 1473–84. doi:10.1038/emboj.2011.91

Yoh, S.M., Lucas, J.S., Jones, K. a, 2008. The Iws1 : Spt6 : CTD complex controls cotranscriptional mRNA biosynthesis and HYPB / Setd2-mediated histone H3K36 methylation. *Genes Dev.* 3422–3434. doi:10.1101/gad.1720008

Chapitre III: CK2 est au centre d'une orchestration complexe de plusieurs voix de régulation de la chromatine pendant l'élongation de la transcription

Emmanuelle Gouot¹, Wajid Bhat¹, Anne Rufiange¹, Eric Fournier¹, Eric Paquet and Amine Nourani^{1*}

1. Centre de recherche sur le cancer de l'Université Laval, L'Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), 9 rue McMahon, Québec, Qc G1R 3S3 Canada

*To whom correspondence should be addressed

E-mail: Amine.Nourani@crhdq.ulaval.ca

3.1. Résumé

CK2 est une protéine kinase essentielle impliquée dans des processus cellulaires variés et conservée dans le domaine eucaryote. Nous avons préalablement montré que CK2 préserve l'organisation chromatinienne lors de l'élongation transcriptionnelle en régulant la fonction du chaperon d'histone Spt6. En effet, par le biais de phosphorylation directes de Spt6, CK2 maintient la fidélité du programme transcriptionnel en limitant la transcription opportuniste liée à des erreurs de l'ARNPII. Dans la présente étude, nous avons établi que CK2 phosphoryle également le partenaire majeur de Spt6 : Iws1. Les sites de phosphorylation ont été identifiés et nous avons montré que la modification de ces résidus n'est pas essentielle aux fonctions d'Iws1 associées à l'organisation de la chromatine lors de l'élongation. Nous avons également démontré *in vitro* que la phosphorylation par CK2 favorise l'interaction Spt6-Iws1 uniquement via la phosphorylation du domaine N-terminal de Spt6. Toutefois, *in vivo*, cette régulation paraît complexe probablement du fait de la régulation de la stabilité de Spt6 par CK2 ainsi que de la nature essentielle de l'interaction Spt6-Iws1 chez la levure. De manière intéressante, nous avons montré que la déplétion de CK2 induit une élévation de l'occupation des complexes transcriptionnels à la chromatine, incluant l'ARNPII ainsi que Spt6-Iws1, et ce indépendamment de la régulation de Spt6 par CK2. Néanmoins, cela ne conduit pas à un changement drastique de la production d'ARNm et pourrait donc refléter l'élévation massive du bruit de fond transcriptionnel en absence de CK2. De plus, notre étude montre que la phosphorylation des sérines 2 du CTD est affectée dans les mutants *ck2^{ts}* ainsi que la mono-ubiquitination de l'histone H2B. Ces observations témoignent clairement de l'implication multifactorielle de CK2 dans des voies de signalisation associées à l'élongation transcriptionnelle. Enfin, notre étude souligne les interactions fonctionnelles complexes qui associent CK2 et PAF dans la modulation de processus liés à l'élongation, tels que la phosphorylation du CTD sur les sérines 2 et la triméthylation d'H3K36. Nos résultats indiquent que CK2 régule Spt6-Iws1 spécifiquement via la phosphorylation de Spt6. Son implication dans l'organisation de la chromatine et la précision du programme transcriptionnel semble cependant très complexe, impliquant très probablement la modulation fonctionnelle de plusieurs facteurs d'élongation. Dans l'ensemble, nos observations établissent un rôle important des voies CK2-dépendantes dans la régulation de la structure de la chromatine et la transcription.

3.2. Abstract

CK2 is an essential protein kinase taking part in various cellular processes and conserved among all eukaryotes. We previously showed that CK2 maintains chromatin organization during transcription elongation by regulating Spt6 histone chaperone function. Importantly, CK2 suppresses spurious transcription and promotes transcriptional accuracy through the phosphorylation of several Spt6 residues. In this study, we established that CK2 also phosphorylates Spt6 partner: Iws1. We mapped the phosphorylation sites and showed that the modification of these residues is not essential for Iws1 functions implicated in chromatin maintenance during elongation. We also demonstrated *in vitro* that CK2 phosphorylation stimulates Spt6-Iws1 interaction only through Spt6 N-terminal phosphorylation. However, *in vivo*, this regulation appears to be complex probably because Spt6 stability is also modulated by CK2. In addition, Spt6-Iws1 interaction is essential for the growth of yeast cells. Interestingly, we showed that CK2 depleted cells have higher level of transcriptional machinery at transcribed regions, including RNAPII, Spt6 and Iws1. This does not depend on Spt6 regulation nor lead to higher mRNA production and thus could be an echo of the massive pervasive transcription in this mutant. Moreover, our study highlights that CTD phosphorylation of serine 2 is affected in *ck2^{ts}* cells along with H2B mono-ubiquitination, clearly reflecting CK2 multifactorial involvement in transcriptional elongation signalling pathways. Finally, we provided evidence of the complex functional interaction between CK2 and PAF complex, implicated in elongation processes such as CTD serine 2 phosphorylation and H3K36 trimethylation. Our data indicate that CK2 regulates Spt6-Iws1 function mainly by Spt6 phosphorylation. Nevertheless, chromatin maintenance and global transcriptional regulation by CK2 seems more complex and probably depend on functional modulation of several elongation factors. Altogether, these findings establish an important role of CK2-dependent pathways in the global regulation of chromatin structure and transcription.

3.3. Introduction

L'homéostasie transcriptionnelle est dépendante de l'organisation de l'ADN dans le noyau sous forme de chromatine. Ainsi, au cours de la transcription, la dynamique des nucléosomes est hautement contrôlée. Plusieurs mécanismes moléculaires collaborent pour permettre la progression de l'ARN polymérase II, et reconstituer l'architecture de la chromatine dans son sillage. Le facteur Spt6 (chapitre 2) occupe une place centrale dans la régulation de ces mécanismes. Il est un garant de l'identité épigénétique des régions transcrites, et l'altération de ses fonctions se traduit par une accumulation massive de transcrits cryptiques intragéniques et antisens qui reflètent l'altération du programme transcriptionnel (Chapitre 2, Cheung et al., 2008; DeGennaro et al., 2013; Uwimana et al., 2017).

D'autres facteurs influencent également considérablement ces processus lors de l'élongation : Chd1, FACT, PAF, Spt4-Spt5, Spt2, Iws1... Parmi eux, Spt5, Spt2 et Iws1 ont été identifiés comme interagissant avec Spt6 ce qui souligne leur coopération fonctionnelle. Spt6 interagit plus spécifiquement avec Iws1 pour former un complexe stable, essentiel chez *S. cerevisiae*, et conservé chez les mammifères (Krogan et al., 2002; Yoh et al., 2007). Comme Spt6, Iws1 est une protéine essentielle chez la levure et conservée chez les eucaryotes supérieurs. Les mutants Iws1 présentent un phénotype Spt- et une létalité synthétique avec les mutants des facteurs d'élongation Spt6, Spt4 et Spt5 (Fischbeck et al., 2002; Lindstrom et al., 2003; McDonald et al., 2010).

Dans le chapitre 2, nous avons démontré pour la première fois que la modification post-traductionnelle de Spt6 régule sa fonction. La phosphorylation par CK2 de la partie N-terminale de Spt6 module la stabilité de la protéine ce qui influence son rôle dans la dynamique des nucléosomes et la suppression de la transcription opportuniste. Le domaine N-terminal est d'une importance considérable dans la régulation fonctionnelle de Spt6. En effet, les interactions Spt6-Iws1 ou Spt6-nucléosomes engagent le même domaine protéique, constitué d'une trentaine de résidus situés en N terminal, Spt6²³⁹⁻²⁶⁸. Ces deux interactions sont compétitives dans la mesure où l'ajout d'Iws1 affecte l'interaction entre Spt6 et les nucléosomes (McDonald et al., 2010). Le modèle proposé est que la formation du complexe Spt6-Iws1 altère l'interaction Spt6-nucléosome et favorise ainsi le relargage

des nucléosomes sur l'ADN lors de leur réassemblage après l'élongation transcriptionnelle (McCullough et al., 2015; McDonald et al., 2010).

Il a de plus été montré chez les mammifères que Spt6 participe au recrutement de la méthyltransférase Set2 d'une façon dépendante d'Iws1 (Yoh et al., 2008). Le complexe Spt6-Iws1 influence ainsi le dépôt co-transcriptionnel de la marque H3K36me3 qui joue un rôle crucial dans la suppression de la transcription cryptique intragénique. Dans ce contexte, des travaux préliminaires du laboratoire indiquent que Spt6 interagit avec Set2 chez la levure. La perte de fonction du mutant *ck2^{ts}* semble affecter cette interaction et pourrait, en conséquence, avoir un impact sur l'interaction Spt6-Iws1 et la triméthylation de H3K36 (Annexe 1-A). Ces observations suggèrent que le modèle selon lequel Spt6-Iws1 recrute Set2 et régule H3K36me3, proposé chez les mammifères, est transférable à la levure et que CK2 semble jouer un rôle régulateur dans cette voie.

Les résidus de Spt6 phosphorylés par CK2 que nous avons identifiés (Chapitre 2) sont localisés en N-terminal, à proximité du domaine d'interaction avec Iws1, et la phosphorylation de Spt6 par CK2 stimule la formation du complexe *in vitro* (Annexe 1-B, C). Ainsi, si la phosphorylation de Spt6 régule sa fonction en modulant sa stabilité, on ne peut toutefois pas exclure une régulation du complexe Spt6-Iws1 en lui-même. Des analyses protéomiques ont par ailleurs mis en évidence que CK2 est purifié avec différents complexes de facteurs d'élongation, et que Spt5 et Iws1 sont phosphorylés *in vivo* sur un site consensus de CK2 et co-purifient avec la kinase (Krogan et al., 2002). De plus, les travaux du laboratoire ont démontré que CK2 régule l'interaction entre Spt6 et Spt2 (Bhat et al., 2013). Le modèle fonctionnel proposé est que Spt2, qui possède un domaine HMG, favorise la liaison de Spt6 avec les nucléosomes lors de l'élongation. Ces observations nous conduisent à supposer que CK2 pourrait influencer l'association de plusieurs facteurs d'élongation pour en moduler leur fonction.

Pour finir, CK2 possède un réseau très complexe de signalisation et a la capacité d'interagir et de potentiellement phosphoryler plusieurs facteurs impliqués dans la régulation de la chromatine au cours de l'élongation (Krogan et al., 2002). En effet, il est montré dans la littérature que CK2, en association avec FACT, phosphoryle le complexe PAF (Bedard et al., 2016). Il est également proposé que FACT-CK2 pourrait phosphoryler Chd1 (Krogan et

al., 2002). L'ensemble de ces facteurs sont critiques pour le maintien de l'organisation de la chromatine au cours de la transcription. Lors de ces processus, ils sont recrutés à la machinerie transcriptionnelle dans des fenêtres spatiotemporelles étroitement liées et sont complémentaires et interdépendants. La signalisation de CK2 au niveau des acteurs chromatiniens pourrait ainsi jouer un rôle plus général d'orchestration de leur fonction les uns vis-à-vis des autres.

Cela nous a conduit à investiguer dans le chapitre 3 la régulation par CK2 d'autres cibles éventuelles impliquées dans la régulation co-transcriptionnelle de l'organisation chromatinienne. Nous avons pu mettre en évidence que le facteur Iws1 est cible de CK2 mais que contrairement à nos hypothèses, cette phosphorylation n'a pas d'impact sur la formation du complexe Spt6-Iws1. De plus, nos expériences *in vivo* ont contredit les données préliminaires selon lesquelles CK2 influencerait H3K36me3 via Spt6-Iws1 et le recrutement de Set2.

Par contre, notre étude a montré que l'absence de CK2 conduit à une élévation de l'occupation de l'ARNPII dans les régions codantes des gènes faiblement ou moyennement transcrits. Il semble néanmoins que les ARNPII excédentaires ne soient pas phosphorylés sur les sérines 2 du CTD et ne soient donc pas dans un état d'activation qui permette la production efficace d'ARNm.

Nous avons également observé que CK2 joue un rôle favorable au dépôt de la marque H2Bub. Cette observation fait écho aux données de la littérature qui suggèrent un rôle régulateur de la kinase sur les fonctions du complexe PAF ainsi que Ubp8. Ainsi, nos résultats mettent en évidence que CK2 régule la précision transcriptionnelle par d'autres biais que la phosphorylation et la stabilité de Spt6, notamment en affectant l'occupation de la machinerie transcriptionnelle sur les régions codantes mais aussi l'ubiquitination co-transcriptionnelle de H2B. La présence de CK2 dans des fractions de purifications regroupant d'autres facteurs essentiels à l'organisation chromatinienne comme Spt5, Spt16 et Chd1, ouvre la voie vers la notion de régulation multifactorielle de la kinase sur divers acteurs chromatiniens lors de l'élongation transcriptionnelle.

3.4. Matériel et méthodes

3.4.1. Souches de levures, plasmides et milieux

Les souches utilisées dans cette étude sont listées dans le tableau 3.1 et ont été construites par des méthodes génétiques classiques chez la levure (croisement) et par transformation (recombinaison homologe). Les cellules exprimant différents allèles *SPT6* ou *IWS1* ont été obtenues par transformation de souches diploïdes *spt6Δ* ou *iws1Δ* avec des plasmides contenant les allèles WT ou mutés suivie de dissection des tétrades. Les allèles *SPT6-FLAG*, *SPT6-TAP*, *IWS1-13MYC*, *IWS1-FLAG*, *CKB2-TAP*, *SET2-FLAG*, *CKA1-13MYC*, *CKA2-13MYC*, *SPT5-FLAG*, *SPT16-FLAG*, *CHD1-FLAG* ont été construits par intégration de chaque épitope en 3' des gènes correspondants (Longtine et al., 1998; Puig et al., 2001). Les allèles *cka1Δ::KANMX6*, *spt6Δ::KANMX6*, *iws1Δ::KANMX6* et *bar1Δ::NatMX4* sont obtenus par remplacement de l'ORF par les marqueurs *KANMX6* ou *NatMX4* (Longtine et al., 1998, Goldstein et al., 1999). La mutation ponctuelle D225N de l'allèle *CKA2* a été introduite comme décrit dans la littérature (Kitazono et al., 2002) avec le marqueur de sélection *NatMX6*. Des méthodes de biologie moléculaire standards ont été employées pour obtenir les différents vecteurs utilisés.

Les plasmides exprimant les protéines de fusion 6xHis- et GST ont été obtenus par insertion de fragments d'ADN amplifiés par PCR dans des vecteurs pET15b (Novagen) et pGEX-4T3 (GE Healthcare) respectivement. La même méthodologie a été utilisée pour générer les plasmides pRS416 et pRS415 (Sikorski et al., 1989) exprimant *IWS1-MYC*. Le vecteur pCC11 *SPT6* WT est décrit par Clark-Adams et Winston, 1987. Les mutants de phosphorylation des *SPT6* et *IWS1* ont été générés par mutagenèse dirigée à l'aide du kit Quik Change Multi Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies). Toutes les mutations ont été contrôlées par séquençage.

Les cellules sont cultivées en YP (1% d'extrait de levure, 2% de peptone) supplémenté avec 2% de glucose à une densité optique à 600 nm DO_{600} d'environ 1. L'arrêt des cellules en G1 (environ 95% des cellules) est effectué sur des souches $\Delta bar1$ par l'ajout dans le milieu de 500 ng/ml de facteur α (Feldan) pendant 2 à 3 heures. L'évaluation de la

croissance des différentes souches à l'étude se fait par des expériences de dilutions en série (spot test) sur les milieux indiqués.

3.4.2.Purification des protéines

Les protéines recombinantes de fusion 6xHis- et GST- ont été exprimées dans des bactéries *Escherichia coli* BL21 et purifiées respectivement sur des billes Ni²⁺-nitrilotriacetic acid (NTA)-agarose (Qiagen) ou Glutathione-Sepharose (GE Healthcare Life Sciences) selon le protocole des compagnies.

La purification en tandem (TAP) de Ckb2 et Spt6 est réalisée d'après Puig et al., 2001. Les levures sont récoltées à une DO₆₀₀=2 puis suspendues et lysées mécaniquement (Beadbeat) dans du tampon de lyse (20 mM Tris HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 5 mM β-glycerophosphate, 5 mM sodium butyrate, 5 mM NaF, 2 µg/ml pepstatin, 2 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 1 mM PMSF et 0.5 mM DTT). Brièvement, les extraits subissent deux étapes de purification réalisées en tandem, la première sur des billes IgG sépharose (GE Healthcare), la seconde sur une résine de calmoduline (Stratagene). Entre ces deux purifications l'étiquette TAP est clivée par la protéase TEV (Tobacco Etch Virus). Les fractions éluées sont analysées par SDS-PAGE suivi de coloration à l'argent.

3.4.3.Essai de phosphorylation *in vitro*

Les essais de phosphorylation in vitro ont été réalisés selon le protocole précédemment décrit (Bhat et al., 2013). Les protéines recombinantes de fusion 6xHis- (1 µg) ont été incubées 30 min à 30°C avec CK2 purifiée de levure dans un tampon Kinase (80 mM NaCl-KCl, 25 mM Tris-HCl [pH 8], 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 µM ATP, et 1 µCi [³²P] ATP). Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel SDS-PAGE 10% qui sera migré, séché et autoradiographié.

3.4.4. Pulldown et co-immunoprécipitation

Les analyses d'interaction *in vitro* par GST pulldown sont réalisées avec 300 ng de protéines GST-Iws1 WT, 3A ou 3D, couplées aux billes (Glutathione-Sepharose) et incubées avec 300 ng de 6xHis-Spt6 WT, ou 7S-D dans un tampon pulldown (20 mM Hepes (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycérol, 100 µg/ml BSA, 0.5 mM DTT, 0.1% NP-40, et 2 µg/ml de leupeptin et pepstatin, et 5 µg/ml aprotinin) pendant 3h at 4°C. Les billes sont lavées trois fois dans du tampon pulldown et les protéines précipitées sont analysées par SDS-PAGE et immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre les étiquettes 6xHis (Clontech 631212) et GST (Sigma G1160). Pour les pulldown impliquant des protéines phosphorylées, les protéines recombinantes sont préalablement incubées dans un tampon de phosphorylation (80 mM NaCl/KCl, 25 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 µM ATP, et CK2 purifiée de levure) pendant 30 minutes à 30°C.

Les expériences de His pulldown sont réalisées avec 300 ng de protéine recombinante 6xHis-Iws1 couplée à des billes Ni-NTA et incubée en quantité égale avec Ckb2-TAP isolé de levure pendant 3h à 4°C dans un tampon pulldown (20 mM Hepes (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycérol, 100 µg/ml BSA, 0.5 mM DTT, 0.1% NP-40, et 2 µg/ml de leupeptin et pepstatin, 5 µg/ml aprotinin). Les billes sont lavées trois fois avec ce même tampon puis les protéines liées aux billes sont analysées par immunobuvardage avec des anticorps anti-TAP (Open Biosystems CAB1001) et anti-His (Clontech 631212).

Les expériences de co-immunoprécipitations sont réalisées comme décrit précédemment par Nourani et al., 2001. 200 ml de culture à une DO₆₀₀=1 sont récoltés et lavés dans du tampon de lavage (20 mM Hepes (pH 7.5), 150 mM NaCl). Les cellules sont ensuite resuspendues dans 1ml de tampon de lyse (20 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycérol, 0.1% Tween 20, 5 mM β-glycérophosphate, 5 mM sodium butyrate, 50 mM NaF, 2 µg/ml de leupeptin et pepstatin, 5 µg/ml d'aprotinin, 1 mM PMSF). Les cellules sont lysées mécaniquement (beadbeat) et les lysats sont décantés par centrifugation. L'immunoprécipitation de Spt6-Flag est réalisée en incubant 5 mg de protéines totales avec 10 µl de billes M2 agarose anti-Flag (Sigma, A2220) dans un tampon d'IP (20 mM HEPES [pH 7.5], 300 mM NaCl, 10% glycérol, 0.1% NP-40, 2 µg/ml de leupeptin et pepstatin, 5 µg/ml d'aprotinin, 1 mM PMSF) à 4°C sur la nuit. Les billes sont lavées trois fois avec le

même tampon, et les protéines précipitées sont séparées sur gel SDS-PAGE et analysées par immunobuvardage avec des anticorps anti-Flag (Sigma F3165) et anti-Myc (Covance MMS-150R). L'immunoprécipitation de Iws1-Flag a été réalisée suivant le même protocole sur un extrait protéique produit à partir de 2L de culture à une $DO_{600}=1$, et incubé aux billes Flag 2h à 4°C. Les protéines immunoprécipitées sur les billes ont été éluées avec de l'H₃PO₄ avant traitement trypsique et analyse en spectrométrie de masse.

3.4.5.Immunobuvardage

Les protéines totales ont été extraites en présence d'acide trichloroacétique, séparées sur gels SDS-PAGE (8 à 15%) et transférées sur membrane de nitrocellulose. Les anticorps utilisés pour l'analyse sont : anti-H3 (Abcam Ab1791), anti-H3K36me3 (Abcam Ab9050), anti-H4 (ab7311, Abcam), anti-Flag (Sigma F3165), anti-Myc (Covance MMS-150R), anti-TAP (Open Biosystems CAB1001), anti His (Clontech 631212), anti GST (Sigma G1160), anti p-Ser5 (Millipore clone 3E8, 04-1572), anti p-Ser2 (Millipore clone 3E10, 04-1571), anti Rpb1 (8WG16 Covance, MMS-126R), anti Pgl1 (Invitrogen 459250)

3.4.6.Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Les analyses de ChIP sont réalisées comme décrit par (Rufiange et al., 2007). Brièvement, 100 ml de cellules à la DO_{600} de 1 est ponté avec une solution de formaldéhyde (5 mM Hepes-KOH pH : 7.5, 10 mM NaCl, 100 nM EDTA pH : 8, 1% Formaldéhyde) durant 20 min. La réaction est arrêtée par l'ajout de glycine (125 mM, concentration finale). La chromatine est extraite par lyse mécanique des cellules au Beat-Beater dans 250 µl de breaking buffer (100 mM Tris-HCl pH : 8, 5% glycérol, 1 mM PMSF) puis lavée à deux reprises avec 1 ml de FA-Lysis Buffer (50 mM Hepes-KOH pH : 7,5, 140 mM NaCl, 2.4 nM Sodium Déoxycholate, 1 mM EDTA pH : 8, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100). La chromatine est soniquée pour obtenir des fragments de taille moyenne de 500 pb.

L'immunoprécipitation est faite sur 100µg de chromatine dans 1 ml de FA-Lysis Buffer et 5% de celui-ci est conservé avant IP comme input. Les immunoprécipitations de Rpb1 sont réalisées avec 1 µL par IP pour chaque anticorps : CTD 8WG16 (Covance, MMS-126R) anti p-Ser5 (Millipore clone 3E8, 04-1572), anti p-Ser2 (Millipore clone 3E10, 04-1571). Les immunoprécipitations de H3 et H3K36me3 nécessitent respectivement 0.5 µL d'anti-H3 (Abcam, 1791) et 0.5 µL d'anti-H3K36me3 (Abcam Ab9050) par IP. Enfin, les ChIP Flag sont réalisés avec 10 µL de billes d'agarose anti-Flag par IP (Sigma, A2220); et les ChIP Myc sont réalisés avec 1 µL d'anti-Myc 9E10 (Covance monoclonal antibodies, MMS-150R) par IP. Les IP sont ensuite lavées (2x FA-Lysis Buffer, 2x FA-Lysis Buffer (500 mM NaCl), 2x ChIP Wash Buffer (10 mM Tri-HCl pH : 8, 250 mM LiCl, 0,5% NP-40, 12 nM Sodium Deoxycholate, 1 mM EDTA pH : 8) 1x TE. Les IP sont éluées dans 250 µl de TE-SDS 1% à 65°C, et incubées à 65°C avec les inputs sur la nuit. L'ADN est traité à la RNase A (Sigma) 1h à 37°C, puis déprotéinisé à la protéinase K (Sigma) 1h à 50°C. Enfin, l'ADN est purifié par phénol-chloroforme, précipité et repris dans 100µL d'eau. Les expériences de ChIP sont analysées par qPCR (LightCycler 480, Roche) en utilisant le qPCR mastermix pour SyberGreen (Roche) avec les oligonucléotides listés dans le tableau 2.2. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicats.

3.4.7. Analyse de ChIP Seq

Un séquençage de nouvelle génération de type Illumina « 50 base pairs single-end reads » a été réalisé pour analyser les ChIP Rpb1 WT vs *ck2^{ts}* (McGill University Genome Innovation Centre, HiSeq 2000). Les séquences obtenues ont été alignées sur le génome de référence de *S.cerevisiae* R64-1-1 (GCA_000146045.2) à l'aide de l'outil bowtie v0.12.8. La couverture a été calculée avec bedtools (<http://bedtools.readthedocs.io/>) puis normalisée en reads par million. Les représentations de type Metagenes ont été obtenues en calculant la moyenne de la couverture pour les régions géniques de 1000 bp en amont à 4000bp en aval de tous les TSS annotés.

Tableau 3.1 : Souches de levures

Nom	Mating Type	Génotype
YAN80	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ
YEG2	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ IWS1-FLAG::KanMX
Spt6 TAP	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ SPT6-TAP::URA3
Spt6 TAP ck2 ^{is}	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT SPT6-TAP::URA3
YAR 489	mat a	leu2_Δ1 lys2-128δ bar1_Δ::NAT ura3-52::HHF1-PGAL1/10-FLAG-HHT1-URA3
YAR 490	mat a	leu2_Δ1 lys2-128δ bar1_Δ::NAT cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT ura3-52::HHF1-PGAL1/10-FLAG-HHT1-URA3
YEG112	mat a	ura3-52 leu2_Δ1 lys2-128δ bar1_Δ::NAT
YEG113	mat a	ura3-52 leu2_Δ1 lys2-128δ bar1_Δ::NAT cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT
YEG61	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ bar1_Δ::KanMX6 spt6_Δ::kanMX6/pcc11 FLAG-SPT6 WT IWS1-13MYC::HIS3
YEG62	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ bar1_Δ::KanMX6 spt6_Δ::kanMX6/pcc11 FLAG-spt6 7S-A IWS1-13MYC::HIS3
YEG63	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ bar1_Δ::KanMX6 spt6_Δ::kanMX6/pcc11 FLAG-spt6 7S-D IWS1-13MYC::HIS3
YEG66	mat a	cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ bar1_Δ::KanMX6 spt6_Δ::kanMX6/pcc11 FLAG-SPT6 WT
YEG114	mat a	trp_Δ63/WT his3_Δ200 ura3-52 leu2_Δ1 lys2-128δ hta1-htb1_Δ::Trp hta1-htb1_Δ::Leu2/pFB1251 HTA1-FLAG-HTB1
YEG115	mat a	cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT trp_Δ63/WT his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ hta1-htb1_Δ::Trp hta1-htb1_Δ::Leu2/pFB1251 HTA1-FLAG-HTB1
YEG116	mat a	ubp8_Δ::KanMX6 trp_Δ63/WT his3_Δ200 ura3-52 leu2_Δ1 lys2-128δ hta1-htb1_Δ::Trp hta1-htb1_Δ::Leu2/pFB1251 HTA1-FLAG-HTB1
YEG28	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ IWS1-13MYC::HIS3 SPT6-FLAG::KanMX cka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT
YEG26	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ IWS1-13MYC::HIS3 SPT6-FLAG::KanMX
YEG117	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ iws1_Δ::kanMX6/pRS416 IWS1-13MYC WT KanMX4::GAL1pr-FLO8::HIS3
YEG118	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ iws1_Δ::kanMX6/pRS416 iws1-13MYC S89A KanMX4::GAL1pr-FLO8::HIS3
YEG119	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ iws1_Δ::kanMX6/pRS416 iws1-13MYC 3A KanMX4::GAL1pr-FLO8::HIS3
YEG120	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ spt6_Δ::kanMX6/pcc11 FLAG-SPT6 WT iws1_Δ::kanMX6/pRS415 IWS1-MYC WT
YEG121	mat α	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ spt6_Δ::kanMX6/pcc11 FLAG-SPT6 WT iws1_Δ::kanMX6/pRS415 iws1-MYC 3A
YEG122	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ spt6_Δ::kanMX6/pcc11 FLAG-SPT6 WT iws1_Δ::kanMX6/pRS415 iws1-MYC 3D
YEG123	mat α	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ spt6_Δ::kanMX6/pcc11 FLAG-spt6 7S-A iws1_Δ::kanMX6/pRS415 IWS1-MYC WT
YEG124	mat α	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ spt6_Δ::kanMX6/pcc11 FLAG-spt6 7S-A iws1_Δ::kanMX6/pRS415 iws1-MYC 3A
YEG125	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ spt6_Δ::kanMX6/pcc11 FLAG-spt6 7S-A iws1_Δ::kanMX6/pRS415 iws1-MYC 3D
YEG126	mat α	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ spt6_Δ::kanMX6/pcc11 FLAG-spt6 7S-D iws1_Δ::kanMX6/pRS415 IWS1-MYC WT
YEG127	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ spt6_Δ::kanMX6/pcc11 FLAG-spt6 7S-D iws1_Δ::kanMX6/pRS415 iws1-MYC 3A
YEG128	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128δ spt6_Δ::kanMX6/pcc11 FLAG-spt6 7S-D iws1_Δ::kanMX6/pRS415 iws1-MYC 3D

Nom	Mating Type	Génotype
YEG101	mat α	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128 δCKA1-13MYC ::KanMX6
YEG102	mat α	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128 δCKA2-13MYC ::KanMX6
YEG129	mat α	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128 δCKA1-13MYC ::KanMX6 CHDI-FLAG::KanMX
YEG130	mat α	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128 δCKA2-13MYC ::KanMX6 CHDI-FLAG::KanMX
YEG131	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128 δCKA1-13MYC ::KanMX6 SPT5-FLAG::KanMX
YEG132	mat α	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128 δCKA2-13MYC ::KanMX6 SPT5-FLAG::KanMX
YEG133	mat α	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128 δCKA1-13MYC ::KanMX6 SPT16-FLAG::KanMX
YEG134	mat α	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128 δCKA2-13MYC ::KanMX6 SPT16-FLAG::KanMX
set2 flag WT	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128 δSET2-FLAG::KanMX
set2 flag ck2 ^{IS}	mat a	his3_Δ200 ura3Δ0 leu2_Δ1 lys2-128 δcka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT SET2-FLAG::KanMX Δcdc73::KanMX6 ura3-52 leu2_Δ1 his3_Δ200 lys2-128 δ
YGL46	mat a	Δcdc73::KanMX6 ura3_Δ0/-52 leu2_Δ1 his3_Δ200 lys2-128 δcka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT
YEG135	mat α	Δpaf1::KanMX6 ura3_Δ0 leu2_Δ1 his3_Δ200 lys2-128 δRPB3-HA::LEU
YGL34	mat α	Δpaf1::KanMX6 ura3_Δ0/-52 leu2_Δ1 his4-912 lys2-128 δcka1Δ0::KanMX6 cka2D225N::NAT
YEG136	mat a	

3.5. Résultats

3.5.1. CK2 phosphoryle le partenaire essentiel de Spt6 : Iws1.

Dans le but de comprendre comment CK2 régule le complexe Spt6-Iws1, nous avons dans un premier temps voulu déterminer si au même titre que Spt6, Iws1 est une cible de la kinase. Afin d'identifier les interacteurs et l'état de phosphorylation d'Iws1 *in vivo*, nous avons réalisé une purification à l'aide de billes M2 agarose anti-Flag couplée à une analyse en spectrométrie de masse, à partir d'extraits protéiques totaux de cellules exprimant Iws1-Flag ou d'une souche contrôle non étiquetée. Nos données de spectrométrie de masse attestent, comme attendu, la forte interaction entre Spt6 et Iws1, avec un enrichissement important en peptides de la protéine Spt6 (Fig. 3.1A). Un seul peptide correspondant à la sous unité régulatrice Ckb2 de CK2 est retrouvé dans notre essai. Ce faible enrichissement ne permet pas d'évoquer une interaction stable entre les deux protéines mais signale une interaction potentielle entre CK2 et Iws1 *in vivo* (Fig. 3.1A). Dans la littérature, un site consensus de CK2 dans la protéine Iws1 a été à plusieurs reprises identifié comme étant phosphorylé *in vivo* sur la Sérine 89 (S₈₉DDD). Notre analyse de spectrométrie de masse a fourni une bonne couverture de cette région d'intérêt avec 9 peptides au total dont 4 sont phosphorylés sur S89 (Fig. 3.1B). L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'Iws1 est phosphorylé *in vivo* par CK2 sur S89, ce qui va dans le sens des données de la littérature. Pour finir, une expérience non présentée ici de co-immunoprécipitation *in vivo* des sous-unités catalytiques de CK2 et d'Iws1-Flag n'a pas permis de mettre en évidence une interaction claire entre CK2 et Iws1. Toutefois le principal partenaire d'Iws1, Spt6, interagit solidement avec la kinase (Chapitre 2). CK2 pourrait donc phosphoryler Iws1 via son lien avec Spt6. Alternativement, l'interaction entre Iws1 et CK2 pourrait être trop labile pour résister au traitement subtil lors de l'expérience. De ce fait, on ne peut donc pas être en mesure de révéler celle-ci par immunoprécipitation.

Nous avons ensuite opté pour une approche plus directe en purifiant la protéine recombinante 6xHis-Iws1 afin de procéder à des analyses *in vitro*. Premièrement, un essai de phosphorylation a été effectué en incubant 6xHis-Iws1 avec CK2 purifiée de levure et du γ 32P ATP. La protéine Iws1 est fortement phosphorylée comme indiqué sur la figure 3.1C.

CK2 a donc la capacité de phosphoryler Iws1 directement *in vitro*. Deuxièmement, un His-pulldown a ensuite été réalisé avec Ckb2-TAP purifiée chez la levure et la protéine 6xHis-Iws1 couplée à des billes d'agarose Ni-NTA. La figure 3.1D montre ainsi que *in vitro*, Iws1 et CK2 ont la capacité d'interagir directement. Les évidences qu'Iws1 est une phosphoprotéine *in vivo* sur un site consensus de CK2 et que CK2 interagit et phosphoryle Iws1 *in vitro* suggèrent fortement que CK2 phosphoryle Iws1 *in vivo*.

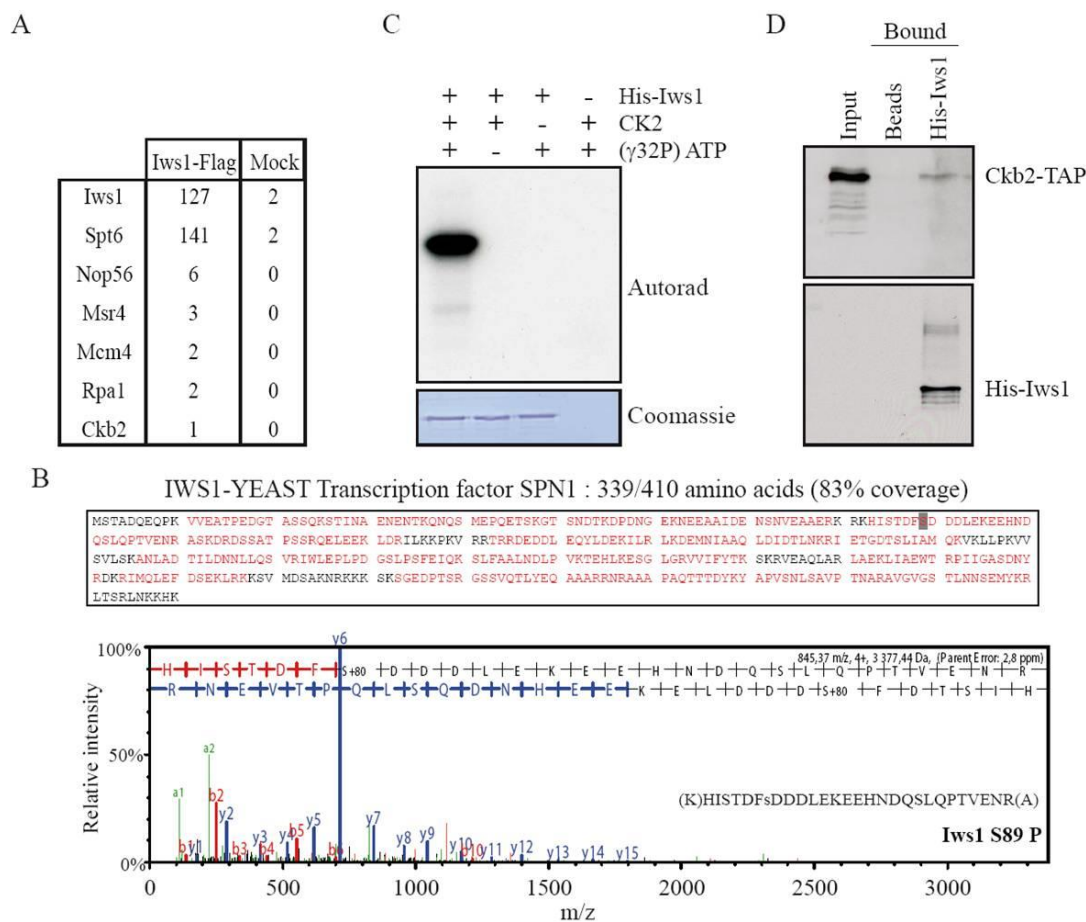


Figure 3.1 : Iws1 est cible de CK2

A- Peptides identifiés en spectrométrie de masse après une purification anti-Flag dans des souches WT exprimant Iws1-Flag ou non étiqueté. **B-** Séquence peptidique d'Iws1 : les peptides couverts par l'analyse en spectrométrie de masse suite à une immunoprécipitation Iws1-Flag *in vivo* sont indiqués en rouge. La sérine 89, identifiée comme phosphorylée est surlignée. Un exemple de spectre qui identifie un peptide avec S89 phosphorylée est présenté. **C-** Essai de Phosphorylation *in vitro* de la protéine recombinante 6xHis-Iws1, incubée avec la Kinase CK2 purifiée de levure en présence de [γ -32P] ATP. Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE et analysées par coloration au bleu de coomassie et autoradiographie. **D-** Essai pulldown réalisé avec des quantités égales de protéine Ckb2-TAP purifiée de levure et de protéine recombinante 6xHis-Iws1. Les billes d'agarose Ni-NTA seules sont utilisées comme contrôle. Les protéines sont séparées sur gel SDS-

PAGE et analysées par immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre les épitopes His et TAP.

Afin d'identifier les résidus phosphorylés par CK2 *in vitro*, nous avons couplé un essai de phosphorylation sur la protéine 6xHis-Iws1 à une analyse en spectrométrie de masse. Cette analyse a fourni une couverture quasi-totale de la séquence peptidique de la protéine recombinante 6xHis-Iws1, et met en évidence 2 résidus phosphorylés *in vitro*, tous deux situés dans la région d'intérêt préalablement identifiée, en N terminal de Iws1 (Fig. 3.2A). Comme attendu, S89 est phosphorylée sur plusieurs peptides détectés dans notre analyse. La thréonine 86 est également phosphorylée, néanmoins seul un peptide détecté présente cette modification dans notre essai. Les deux résidus phosphorylés d'Iws1 sont très proches et situés dans une région acide de la partie N terminale de la protéine ST₈₆DFS₈₉DDD. Pour étudier directement la capacité de CK2 à phosphoryler les résidus identifiés, nous avons généré des versions mutantes de la protéine 6xHis-Iws1, dans lesquels les acides aminés d'intérêt sont mutés en alanine non phosphorylable. La S89 phosphorylée a été identifiée *in vivo* et *in vitro*, et semble être le résidu le plus intéressant à investiguer dans ce contexte. Cependant, S85 et T86 sont également des cibles potentielles pour CK2. Ainsi, nous avons généré 2 mutants non phosphorylables : 6xHis-Iws1 S89A, et 6xHis-Iws1-3A dans lequel les 3 acides aminés indiqués en figure 3.2B sont mutés en alanine. Un essai de phosphorylation sur les protéines recombinantes 6xHis-Iws1 WT ou mutantes nous a permis de montrer que CK2 perd drastiquement sa capacité à phosphoryler le mutant Iws1 S89A (Fig. 3.2C). Le faible signal de phosphorylation persistant est perdu avec le mutant Iws1-3A. Ainsi, nos résultats montrent que CK2 interagit et phosphoryle Iws1 majoritairement sur la sérine 89. La sérine 89 étant retrouvée dans différentes études *in vivo* (Albuquerque et al., 2008; Krogan et al., 2002), est sans aucun doute le résidu le plus important mais nous avons choisi pour la suite de notre étude de travailler également avec le mutant Iws1-3A afin de se prémunir d'éventuels événements de phosphorylation non spécifiques ou promiscuitaires sur S85 et T86 qui pourraient contrebalancer la mutation S89A.

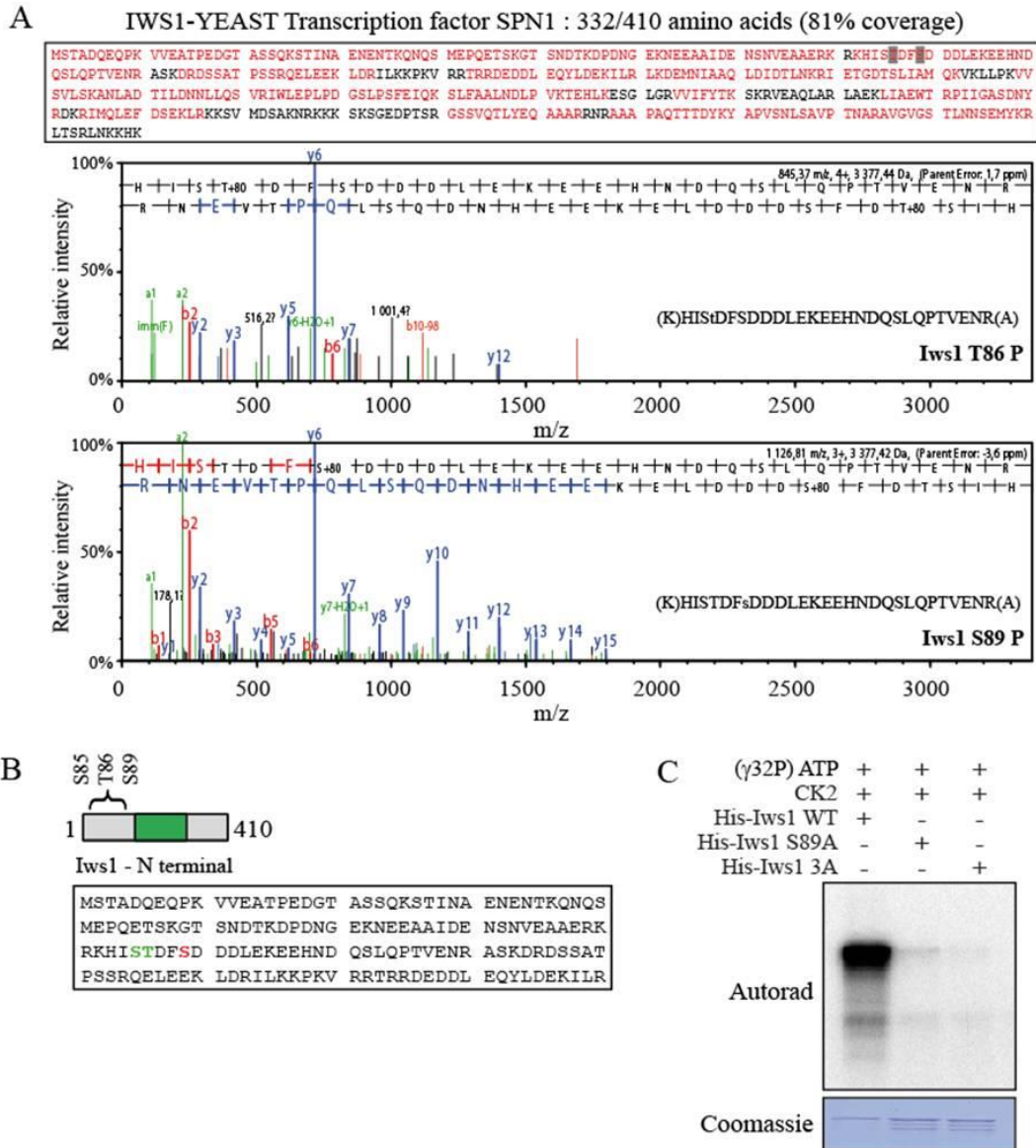


Figure 3.2 : Identification des sites des phosphorylation par CK2 dans la région N terminale d'Iws1

A- Séquence peptidique de la protéine 6xHis-Iws1 phosphorylée *in vitro* et analysée en spectrométrie de masse. Les peptides couverts sont indiqués en rouge et les résidus phosphorylés sont surlignés (T86, S89). En dessous, deux exemples de spectres représentant des peptides phosphorylés sur les résidus T86 et S89 de la protéine Iws1 identifiés en spectrométrie de masse. **B-** Séquence peptidique de la région N-terminale d'Iws1 et schéma représentant les sites potentiels de phosphorylation par CK2. Le domaine d'interaction avec Spt6 est représenté en vert. Le résidu Sérine 89, identifié dans la littérature et dans nos expériences comme étant phosphorylé *in vivo* est indiqué en rouge, la Sérine 85 et la Thréonine 86 sont indiqués en vert. **C-** Essai de Phosphorylation *in vitro* des protéines recombinantes 6xHis-Iws1 WT et des mutants non phosphorylables 6xHis-Iws1 S89A et 6xHis-Iws1 3A (S85/T86/S89-A), incubées avec la Kinase CK2 purifiée de levure en présence de [γ -32P] ATP. Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE et analysées par coloration au bleu de coomassie et autoradiographie.

3.5.2. L'interaction Spt6-Iws1 *in vitro* est uniquement stimulée par la phosphorylation de Spt6

La description précise des domaines d'interaction entre Spt6 et Iws1 par cristallographie a permis de mettre en évidence la nature essentielle de la formation du complexe *in vivo* (McDonald et al., 2010). En effet, la mutation des résidus conduisant à l'abrogation totale de l'interaction Spt6-Iws1 est létale chez *S.cerevisiae*. Un affaiblissement partiel de l'interaction conduit à une thermosensibilité ainsi qu'à l'apparition d'un phénotype *SPT*-qui traduit des défauts d'organisation de la chromatine (McDonald et al., 2010). Des résultats préliminaires du laboratoire ont mis en évidence que la phosphorylation de Spt6 par CK2 stimule l'interaction Spt6-Iws1 *in vitro* et pourrait ainsi jouer un rôle critique dans la régulation fonctionnelle du complexe (Annexe 1-B). L'utilisation d'un mutant phosphomimétique de Spt6, 6xHis-Spt6 7S-D, dans lequel les sérines phosphorylées par CK2 sont mutées en acide aspartique pour mimer une phosphorylation constitutive, a permis de confirmer ces résultats. En effet, un GST-pulldown avec les protéines GST-Iws1 et 6xHis-Spt6 WT ou 7S-D montre que GST-Iws1 interagit plus stablement avec Spt6 7S-D, confirmant que la phosphorylation de Spt6 par CK2 favorise son interaction avec Iws1 (Annexe 1-C).

Nous nous sommes donc demandé si la phosphorylation d'Iws1 avait elle aussi un rôle modulateur. Afin de tester directement l'impact de la phosphorylation par CK2 sur la stabilité de complexe, nous avons réalisé un GST pull down avec GST-Iws1 WT ou 3A non phosphorylable et 6xHis-Spt6 en présence ou en absence de CK2 fonctionnelle. Les différentes protéines ont été ou non phosphorylées *in vitro* préalablement au pull down comme indiqué sur la figure 3.3A. Comme mentionné plus haut, la phosphorylation par CK2 stimule l'interaction Spt6-Iws1 *in vitro*, en revanche on observe que la forme mutante GST-Iws1-3A, où les résidus d'intérêt sont mutés en alanine non phosphorylables, interagit de façon équivalente avec 6xHis-Spt6. De plus, nous avons effectué une expérience de GST pull down avec les formes WT ou phosphomimétique (3D) d'Iws1. La figure 3.3B montre que 6xHis-Spt6 WT co-purifie de façon équivalente avec GST-Iws1 WT ou 3D. De la même façon, 6xHis-Spt6 7S-D interagit également de façon comparable avec GST-Iws1

WT et 3D. La mutation des résidus d'Iws1 potentiellement phosphorylés par CK2 en acide aspartique n'affecte donc pas l'interaction Spt6-Iws1 *in vitro*. Ainsi, ces expériences *in vitro* montrent que la phosphorylation d'Iws1 par CK2 ne semble pas avoir d'influence sur la stabilité du complexe Spt6-Iws1, contrairement à la phosphorylation de Spt6 en N-terminal.

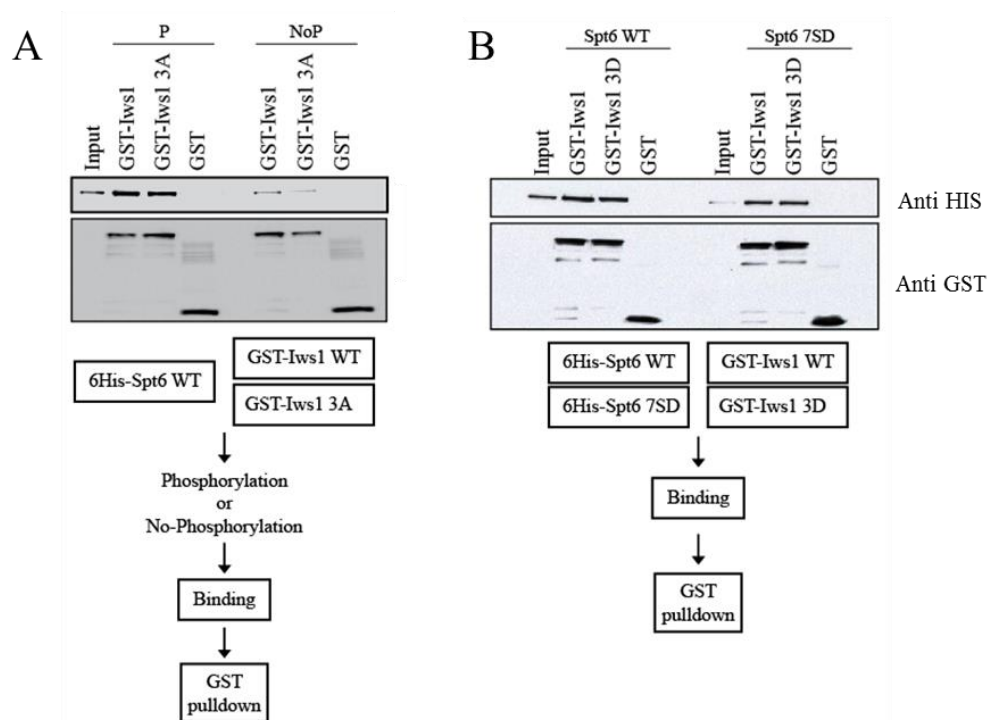


Figure 3.3 : La phosphorylation de Iws1 par CK2 ne stimule pas la formation du complexe Spt6-Iws1 *in vitro*

A- Analyse de l'interaction *in vitro* des protéines recombinantes 6xHis-Spt6 et GST-Iws1 WT ou 3A non phosphorylable par GST pulldown. GST seul est utilisé comme contrôle négatif. Les protéines recombinantes GST-Iws1 WT ou GST-Iws1-3A sont incubées avec 6xHis-Spt6 en quantité égale et phosphorylées ou non *in vitro* avant d'être purifiées en présence de CK2 purifiée de levure et d'ATP. **B-** Analyse de l'interaction *in vitro* des protéines recombinantes 6xHis-Spt6 WT ou 7S-D et GST-Iws1 WT ou 3D phosphomimétique par GST pulldown. GST seul est utilisé comme contrôle négatif. Les protéines recombinantes GST-Iws1 WT ou GST-Iws1-3D sont incubées avec 6xHis-Spt6 WT ou 7S-D en quantité égale puis purifiées. Les protéines sont séparées sur gel de SDS-PAGE et analysées avec des anticorps dirigés contre les étiquettes His et GST.

3.5.3. L'interaction Spt6-Iws1 *in vivo* ne dépend pas de CK2

Nous avons jusqu'ici montré par des analyses *in vitro* que CK2 semble stabiliser le complexe Spt6-Iws1 via la phosphorylation de Spt6 mais pas celle d'Iws1. Afin d'évaluer l'importance de CK2 *in vivo*, dans la régulation de la formation du complexe, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation de Spt6 et Iws1 dans des mutants *ck2^{ts}*. Dans cette optique, nous avons généré de souches WT et *ck2^{ts}* qui expriment Flag-Spt6 et Iws1-Myc afin de purifier Flag-Spt6 et d'analyser par immunobuvardage le niveau d'Iws1-Myc qui co-précipite à la température restrictive de 37°C. Des souches dans lesquelles Spt6 est non étiquetée sont utilisées comme contrôle. Comme indiqué sur la figure 3.4A, le niveau d'Iws1-Myc est équivalent dans les extraits totaux (input) des souches WT et *ck2^{ts}*. Par contre, la quantité totale de Flag-Spt6 dans la souche *ck2^{ts}* est drastiquement diminuée par rapport au WT, reflétant l'importance de CK2 dans la stabilité de la protéine (Chapitre 2). Concernant l'interaction Spt6-Iws1, le niveau d'Iws1-Myc immunoprécipité par la purification de Flag-Spt6 est inchangé en présence ou en absence de CK2 fonctionnelle ce qui va à l'encontre des données obtenues *in vitro*. Afin de nous assurer que l'interaction Spt6-Iws1 n'est pas affectée par l'absence de CK2 *in vivo*, nous avons donc également utilisé une approche alternative plus stringente de purification en tandem (TAP). Les cellules WT et *ck2^{ts}* utilisées dans cette expérience expriment Spt6-TAP. Les produits de purification de Spt6 à une température permissive (30°C) ou restrictive (37°C) ont été séparés sur gel SDS-PAGE et analysés par coloration à l'argent. Comme précédemment, on observe que l'inactivation de CK2 n'affecte pas l'interaction Spt6-Iws1 dans des extraits protéiques totaux (Fig. 3.4B). Ainsi, nos analyses *in vivo* contredisent l'hypothèse selon laquelle CK2 régule la formation du complexe Spt6-Iws1.

En résumé, la phosphorylation de Spt6 par CK2 stimule l'interaction avec Iws1 *in vitro*, ce que nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence *in vivo*. De plus, la quantité totale de Spt6 est affectée sans pour autant avoir un effet sur le complexe dans des extraits totaux *in vivo*. Nous suspectons donc que la stabilité de Spt6 est affectée quand Spt6 n'est pas complexé à Iws1.

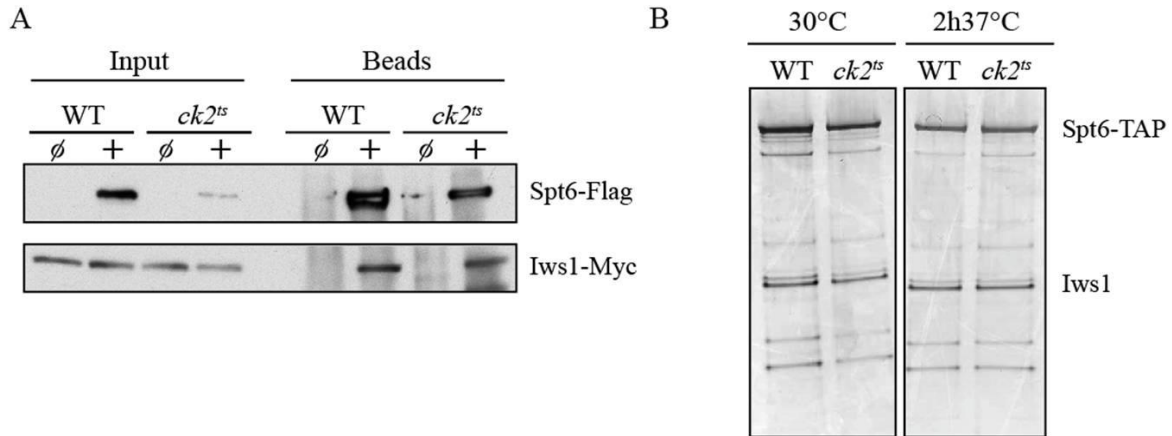


Figure 3.4 : CK2 ne semble pas affecter l'interaction Spt6-Iws1 in vivo

A- Co-Immuno-précipitation de Flag-Spt6 et Iws1-Myc. Des souches WT et *ck2^{ts}* exprimant Iws1-Myc sont transformées avec Pcc11 Flag-Spt6 ou un vecteur vide qui sert de contrôle. Les protéines totales sont extraites après 2h à 37°C et purifiées sur des billes d'agarose anti-Flag. Les protéines purifiées sont séparées sur gel et analysées par immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre les épitopes Flag et Myc. B- Purification de Spt6-TAP sur des extraits protéiques totaux issus de souches WT et *ck2^{ts}* exprimant Spt6-TAP à 30°C et après 2h à 37°C. Les protéines purifiées sont séparées sur des gels SDS-PAGE de gradient 4-12% et analysées par coloration à l'argent.

3.5.4. Fonctionnellement, seule la phosphorylation de Spt6 semble importante dans le maintien de la chromatine au cours de la transcription

Dans le chapitre 2, nous avons montré que la phosphorylation de Spt6 par CK2 est fondamentale pour sa fonction. Un défaut de phosphorylation conduit en effet à l'apparition de phénotypes *SPT-* et de transcription cryptique au niveau du gène *FLO8*. Si la stabilité de Spt6 est un enjeu de la régulation dépendante de CK2, nos analyses d'interaction *in vitro* et l'effet sur la stabilité du complexe nous ont conduits à penser que le complexe Spt6-Iws1 en tant que tel pouvait être fonctionnellement régulé par CK2. Contrairement à la phosphorylation de Spt6, la phosphorylation d'Iws1 par CK2 ne semble pas affecter son interaction avec Spt6 *in vitro*, il est néanmoins possible qu'elle soit critique pour la fonction de la protéine *in vivo*.

Nous avons investigué le rôle fonctionnel potentiel des sites de phosphorylation par CK2. Pour cela, nous avons étudié l'effet de leur mutation en résidus non phosphorylables

(Alanine) pour des phénotypes connus associés à des défaillances d'Iws1, qui traduisent des défauts d'organisation de la chromatine. Par exemple, une mutation d'Iws1 qui altère son interaction avec Spt6 présente un phénotype *SPT*⁻. Ce phénotype correspond à la suppression d'insertion δ dans le promoteur du gène *LYS2*. Une souche WT portant l'allèle rapporteur *lys2-128 δ* n'est pas capable de pousser sur un milieu dépourvu en lysine. En revanche, un mutant Iws1 qui induit un défaut d'organisation de la chromatine au niveau du promoteur de *LYS2* peut concéder aux cellules la capacité à transcrire *LYS2* et à pousser sur SC-Lys. Pour tester ce phénotype, nous avons construit différentes souches de levures qui expriment les mutants non phosphorylables Iws1 S89A ou Iws1-3A, et qui portent l'allèle rapporteur *lys2-128 δ* . La figure 3.5A indique que les mutants non phosphorylables de Iws1 ne présentent ni défaut de croissance à température permissive ou restrictive, ni phénotype *SPT*⁻. Nous avons ensuite réalisé la même expérience mais dans des souches qui portent la construction *pGAL-FLO8-HIS3* afin d'évaluer si la phosphorylation d'Iws1 est importante pour supprimer le phénotype de transcription cryptique intragénique au gène *FLO8*. Dans ce cas, des défauts d'organisation de la chromatine au niveau du gène *FLO8* sont associés à l'activation du promoteur cryptique en 3' de sa région codante et donc à la transcription de *HIS3*. En conséquence, les cellules acquièrent la capacité de pousser sur un milieu dépourvu en histidine. La figure 3.5B montre que les cellules exprimant les mutants Iws1 S89A et Iws1-3A ne poussent pas sur Sc-His et n'ont donc pas de phénotype de transcription cryptique à *FLO8*. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que la phosphorylation d'Iws1 par CK2 à elle seule n'est pas essentielle pour la fonction de maintien de structure de la chromatine d'Iws1.

Par opposition, CK2 agit directement sur la fonction de Spt6 en phosphorylant son domaine N terminal. Nous nous sommes donc demandé si la phosphorylation d'Iws1 pouvait agir en synergie avec celle de son partenaire Spt6. Pour cela, nous avons construit des souches portant l'allèle rapporteur *lys2-128 δ* dont les gènes Iws1 et Spt6 sont invalidés et compensés par des vecteurs exprimant Spt6 et Iws1 WT ou mutants (Fig. 3.5C). L'ensemble des combinaisons des formes phosphomimétiques ou non phosphorylables de Spt6 et Iws1 ont été testées. Dans le chapitre 2, nous avons montré que les phosphomutants de Spt6 arborent un phénotype *SPT*⁻ sur Sc-Lys, et le mutant non phosphorylable *spt6 7S-A*

est thermosensible à 39°C. La combinaison avec Iws1-3A ou 3D n'aggrave ni ne supprime les phénotypes observés au préalable (Fig. 3.5C). En résumé, CK2 phosphoryle Iws1 sans pour autant moduler sa fonction dans l'organisation de la chromatine lors de l'élongation transcriptionnelle. La régulation fonctionnelle de Spt6-Iws1 par CK2 semble donc uniquement attribuée à la phosphorylation de Spt6 dans ce contexte.

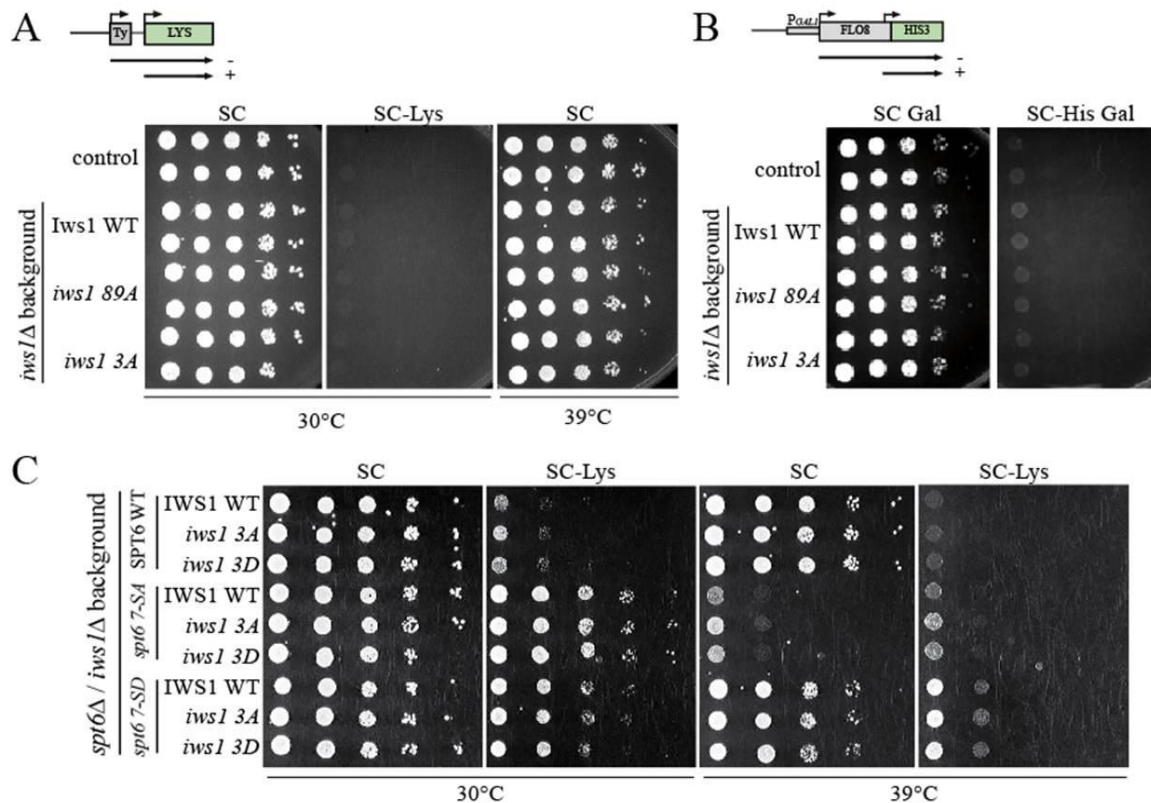


Figure 3.5 : La régulation par CK2 de Spt6-Iws1 est indépendante de la phosphorylation d'Iws1

La mutation des sites consensus de phosphorylation par CK2 d'Iws1 en résidu Alanine (A) non phosphorylable ou Acide Aspartique (D) n'induit pas de phénotype propre aux défauts de restructuration de la chromatine. A- Dilution en série des souches contrôle et *iws1Δ* exprimant Iws1 WT, S89A ou 3A portant l'allèle rapporteur *lys2-128δ*, sur milieu SC ou SC-Lys dépourvu en lysine à 30 et 39°C. B- Dilution en série des souches contrôle et *iws1Δ* exprimant Iws1 WT, S89A ou 3A portant l'allèle rapporteur de transcription cryptique pGAL1-*FLO8 HIS3* sur milieu SC ou SC-His dépourvu en histidine avec du Galactose comme source de carbone. C- Des souches portant l'allèle rapporteur *lys2-128δ* et exprimant les combinaisons indiquées des mutants de phosphorylation Spt6 et Iws1 sont diluées en série sur SC et SC-Lys à 30°C et 39°C. Aucune aggravation des phénotypes des mutants Spt6 7S-A et 7S-D n'est observée quand Iws1 est également muté.

3.5.5. CK2 influence indirectement le recrutement de Spt6-Iws1 aux régions transcrites.

La machinerie transcriptionnelle est composée de l'ARNPII et de multiples facteurs nécessaires à la transcription. Spt6 et Iws1 sont deux facteurs d'élongation qui colocalisent avec l'ARNPII et sont enrichis sur les régions transcrites (Mayer et al., 2010). Iws1 possède des fonctions indépendantes de Spt6. Il a notamment été impliqué dans l'initiation transcriptionnelle au gène *CYC1*, où il est recruté en premier et favorise le recrutement consécutif de Spt6 (Fischbeck et al., 2002; Zhang et al., 2008). De façon schématique, le recrutement de Spt6 à la chromatine est toutefois un prérequis pour celui d'Iws1. En effet, dans des mutants *spt6-1004*, le niveau d'Iws1 à la chromatine est drastiquement affecté. En revanche, l'enrichissement de Spt6 aux régions codantes ne varie pas de façon majeure dans des mutants *iws1-7* (Fig. 3.S1).

La phosphorylation de Spt6 par CK2 régulant la fonction de la protéine, il est donc possible que l'absence de CK2 fonctionnelle altère le recrutement ou la formation du complexe sur la chromatine. Dans des conditions transcriptionnelles basales et aux gènes constitutivement actifs, la phosphorylation de Spt6 ne semble pas affecter drastiquement son recrutement à la chromatine (Chapitre 2). Nous nous sommes demandé si le recrutement consécutif d'Iws1 pouvait quant à lui être influencé par l'état de phosphorylation de Spt6 dépendant de CK2. Ainsi, nous avons réalisé des ChIP sur des chromatines issues de souches exprimant les différents allèles Flag-Spt6 WT, 7S-A et 7S-D, ainsi que Iws1-Myc, à 30°C et après un choc thermique de 2h à 37°C. Une souche non-étiquetée est utilisée comme contrôle (Fig. 3.6). Comme attendu, un ChIP dirigé contre Flag-Spt6 atteste que le niveau de Spt6 à la chromatine ne varie pas aux gènes constitutivement actifs *CLN3*, *PMA1* et *ACT1*, selon que la protéine est dans un état qui mime ou non la phosphorylation par CK2 (Fig. 3.6A). Un ChIP Iws1-Myc réalisé sur les mêmes chromatines indique qu'un mutant non-phosphorylable (7S-A) ou phosphomimétique (7S-D) permet le recrutement d'Iws1-Myc aux régions codantes *CLN3*, *PMA1* et *ACT1* de façon similaire à Spt6 WT (Fig. 3.6B). Ainsi, la phosphorylation de Spt6 par CK2 ne semble pas influencer le recrutement d'Iws1 dans des conditions transcriptionnelles de base.

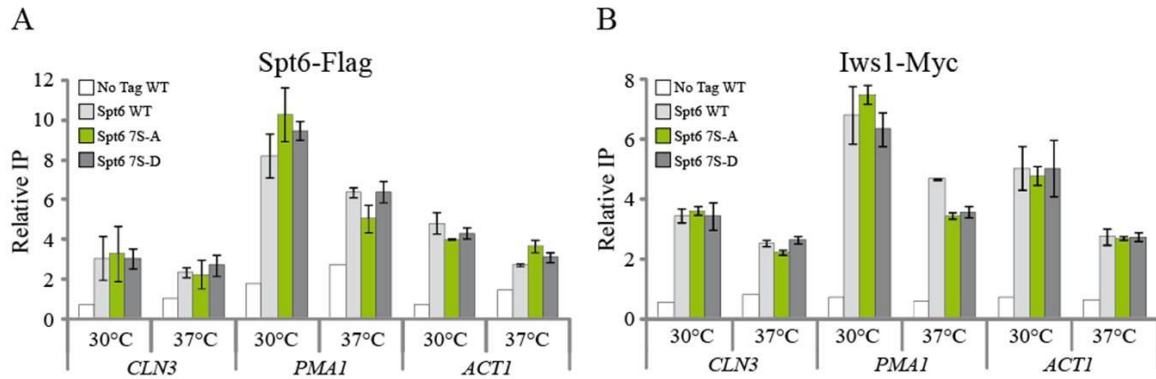


Figure 3.6 : L'état de phosphorylation de Spt6 dépendant de CK2 n'influence ni son recrutement, ni le recrutement d'Iws1 aux gènes constitutivement actifs

A- ChIP Flag-Spt6 sur des chromatines extraites de souches WT ou *spt6Δ* portant les vecteurs Pcc11 Flag-Spt6 WT, 7S-A ou 7S-D 30°C et exprimant Iws1-Myc après un choc thermique de 2h à 37°C. L'association de Flag-Spt6 WT ou mutant à la chromatine a été analysée par qPCR aux gènes transcrits *CLN3*, *PMA1* et *ACT1* et normalisée par rapport à l'occupation à la région intergénique contrôle *NoORF*. Une souche non étiquetée est utilisée comme contrôle. **B-** ChIP Iws1-Myc sur les mêmes chromatines que 6A. L'association d'Iws1 à la chromatine a été analysée par qPCR aux gènes transcrits *CLN3*, *PMA1* et *ACT1* et normalisée par rapport à l'occupation à la région intergénique contrôle *NoORF*. Une souche non étiquetée est utilisée comme contrôle. Les valeurs indiquées représentent la moyenne et l'erreur standard de trois expériences indépendantes.

Afin de savoir si CK2 peut influencer le recrutement d'Iws1 aux régions codantes indépendamment de Spt6, nous avons ensuite directement évalué le niveau d'Iws1 à la chromatine dans des mutants *ck2^{ts}*. Pour cela, nous avons utilisé des souches WT et *ck2^{ts}* qui expriment Iws1-Myc et Spt6-Flag, récoltées à 30°C et après 2h à 37°C. De façon surprenante, le ChIP Iws1-Myc présenté sur la figure 3.7A indique une augmentation significative de plus de deux fois du niveau d'Iws1-Myc à 30°C et 37°C dans les mutants *ck2^{ts}* aux gènes *PMA1* et *ACT1*. Nous avons réalisé en parallèle un ChIP Spt6-Flag sur les mêmes chromatines qui montre également que le niveau de Spt6-Flag est près de deux fois supérieur aux gènes constitutifs *PMA1* et *ACT1* dans les mutants *ck2^{ts}* (Fig. 3.7B). Ainsi, en absence de CK2 fonctionnelle, le complexe Spt6-Iws1 semble plus recruté sur les régions transcrites. Cependant, les résultats présentés à la figure 3.6 indiquent que l'état de phosphorylation de Spt6 dépendant de CK2 n'affecte pas le recrutement du complexe dans les régions codantes *PMA1* et *ACT1*. Ainsi, l'élévation du niveau de Spt6-Iws1 pourrait être

une conséquence indirecte de l'absence de CK2. Spt6 et Iws1 suivent l'ARNPII au cours de la transcription, et leur présence à la chromatine reflète généralement un état transcriptionnel actif. Nous avons donc ensuite évalué le niveau d'ARNPII dans notre expérience, par ChIP dirigé contre la sous-unité Rpb1. L'analyse du ChIP Rpb1 aux mêmes loci *PMA1* et *ACT1*, indique une augmentation significative du niveau d'ARNPII (Fig. 3.7C). Ainsi, il semble que l'absence de CK2 provoque une accumulation de complexe transcriptionnel, comprenant l'ARNPII et des facteurs d'élongation comme Spt6 et Iws1, aux régions transcrites, plutôt qu'un effet direct sur le complexe. Pour apprécier plus précisément cet effet, nous avons choisi de normaliser les niveaux d'Iws1 et de Spt6 par rapport au niveau de Rpb1. Le ratio Iws1-Myc/Rpb1 est similaire dans les cellules WT et *ck2^{ts}*, favorisant l'hypothèse d'un recrutement global plus élevé de la machinerie transcriptionnelle en absence de CK2 (Fig. 3.7D). Par contre, le ratio Spt6-Flag/Rpb1 diminue de façon significative à 37°C mais pas à 30°C (Fig. 3.7E). Cette diminution du niveau de Spt6 au regard de l'ARNPII dans les mutants *ck2^{ts}* contrairement à Iws1, reflète une régulation directe de la protéine cohérente avec un défaut de stabilité comme décrit dans le chapitre 2.

Ainsi, l'ensemble de nos expériences montre que la phosphorylation de Spt6 et Iws1 n'influence pas directement leur recrutement à la chromatine. En revanche, en absence de CK2, la machinerie transcriptionnelle, comprenant au moins l'ARNPII, Spt6 et Iws1, est plus abondante aux régions transcrites étudiées. Le niveau de Spt6 est cependant limité au regard de l'ARNPII, reflétant le défaut de stabilité de la protéine lorsqu'elle n'est pas phosphorylée. Curieusement, le niveau d'Iws1 normalisé sur celui de la polymérase n'est pas affecté. Iws1 interagit avec l'ARNPII et son recrutement lors de la transcription est également en grande partie dépendant de Spt6. Il est donc envisageable que les cellules contournent le déficit en Spt6 en compensant par un recrutement alternatif d'Iws1, via l'ARNPII directement par exemple.

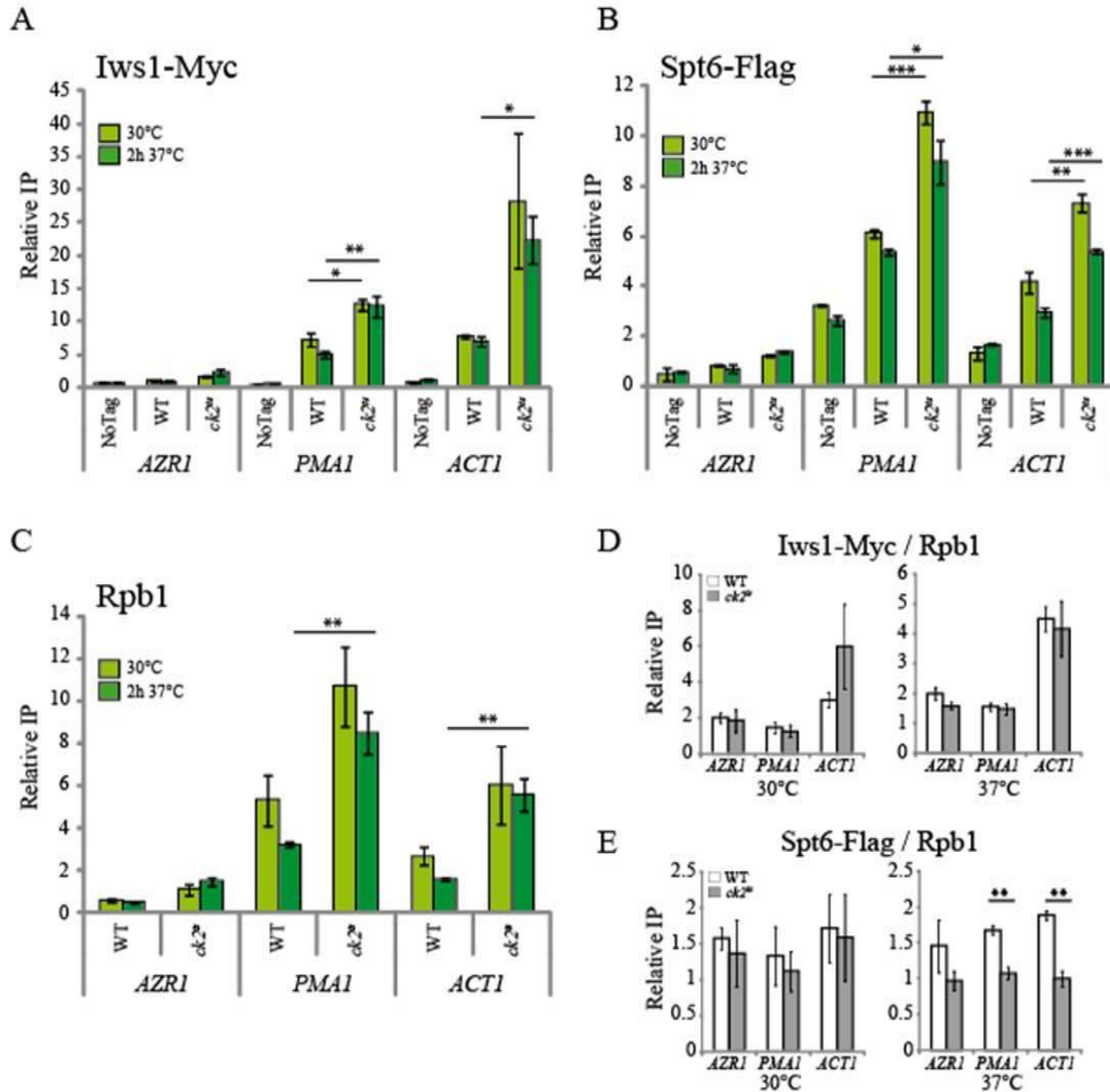


Figure 3.7 : Le recrutement d'Iws1 à la chromatine n'est pas affecté dans les mutants ck2ts au regard du recrutement de l'ARNPII

La phosphorylation de Spt6 par CK2 n'est pas essentielle au recrutement d'Iws1 aux régions codantes. **A-** ChIP Iws1-Myc et **B-** ChIP Spt6-Flag sur des chromatines extraites de souches WT ou *ck2^{ts}* exprimant Iws1-Myc et Spt6-Flag à 30°C et après un choc thermique de 2h à 37°C. L'association d'Iws1-Myc et Spt6-Flag à la chromatine a été analysée par qPCR aux gènes transcrits *PMA1* et *ACT1*, au gène non transcrit *AZR1* et normalisée par rapport à l'occupation à la région intergénique contrôle *NoORF* (région sub-télomérique du chromosome V). Une souche non étiquetée est utilisée comme contrôle. **C-** ChIP Rpb1 sur les chromatines extraites des mêmes souches que A- et B-, WT ou *ck2^{ts}* à 30°C et après un choc thermique de 2h à 37°C. L'association de Rpb1 à la chromatine a été analysée par qPCR aux gènes transcrits *PMA1* et *ACT1*, au gène non transcrit *AZR1* et normalisée par rapport à l'occupation à la région non transcrite contrôle *NoORF*. **D- E-** Ratio de l'occupation de Iws1-Myc / Rpb1 et Spt6-Flag/Rpb1 à *AZR1*, *PMA1* et *ACT1* à 30°C et 37°C. Les valeurs indiquées représentent la moyenne et l'erreur standard de trois expériences indépendantes.

3.5.6. CK2 n'est pas requis dans le processus de triméthylation d'H3K36 sur les régions codantes

L'importance du complexe Spt6-Iws1 est démontrée chez les mammifères dans la régulation du processus de recrutement de Setd2 et le dépôt consécutif de H3K36me3 lors de l'élongation transcriptionnelle (Yoh et al., 2008). Des données préliminaires du laboratoire ont montré que Spt6 interagit avec Set2 également chez la levure, et ont impliqué CK2 dans la régulation de cette interaction. L'hypothèse de départ était que CK2 régulerait directement l'interaction Spt6-Iws1 pour favoriser le recrutement de Set2 à la machinerie transcriptionnelle et la triméthylation de H3K36 comme indiqué sur le modèle en figure 3.8A. Cependant, si les données *in vitro* corroborent ce modèle, nos analyses *in vivo* indiquent que CK2 régule la fonction de Spt6 à la chromatine sans pour autant affecter ni la fonction, ni le recrutement d'Iws1.

Pour clarifier cela, nous avons décidé d'évaluer directement les conséquences de l'inactivation de CK2 sur la triméthylation de H3K36. Tout d'abord, nous avons réalisé une analyse par immunobuvardage avec un anticorps spécifiquement dirigé contre H3K36me3, sur des extraits protéiques totaux de souches WT et *ck2^{ts}* récoltées à 30 et 37°C (Fig. 3.8B). Les signaux pour H3 total et H4 total servent de contrôles de dépôt. Les résultats de 2 clones indépendants sont présentés et indiquent que le niveau total d'H3K36me3 diminue globalement à 37°C dans les mutants *ck2^{ts}* mais n'est pas affecté au regard du niveau global d'H3 et H4, qui diminuent de façon similaire. Pour étudier plus directement et précisément la voie Set2-H3K36me3 dans *ck2^{ts}*, nous nous sommes concentrés sur la fraction chromatinienne et avons analysé par ChIP l'impact de l'inactivation de CK2 sur le recrutement de Set2-Flag. A 30°C, le recrutement de Set2-Flag est similaire dans les cellules WT et *ck2^{ts}* au gène non transcrit *AZRI*, ainsi qu'aux gènes transcrits *ACT1* et *PMA1*. En revanche, à 37°C, on observe une diminution d'environ 30% du recrutement de Set2-Flag à *ACT1* et *PMA1* (Fig. 3.8C). Il est intéressant de noter que ces loci présentent également à 37°C un déficit en Spt6 par rapport à l'ARNPII comme indiqué sur la figure 3.7E, ce qui pourrait être cohérent avec un défaut d'interaction entre Spt6 et Set2 en absence de CK2. Pour finir, nous avons directement évalué par ChIP le niveau relatif à H3 total de H3K36me3. Contrairement à nos attentes, la triméthylation de H3K36me3 dans les régions transcrites *ACT1* et *PMA1* est similaire dans les cellules WT et *ck2^{ts}* (Fig. 3.8D).

Ainsi, nos résultats indiquent que l'absence de CK2 fonctionnelle peut partiellement affecter le recrutement de Set2 aux régions transcrites sans pour autant avoir d'impact clair sur la triméthylation d'H3K36 à ces mêmes loci.

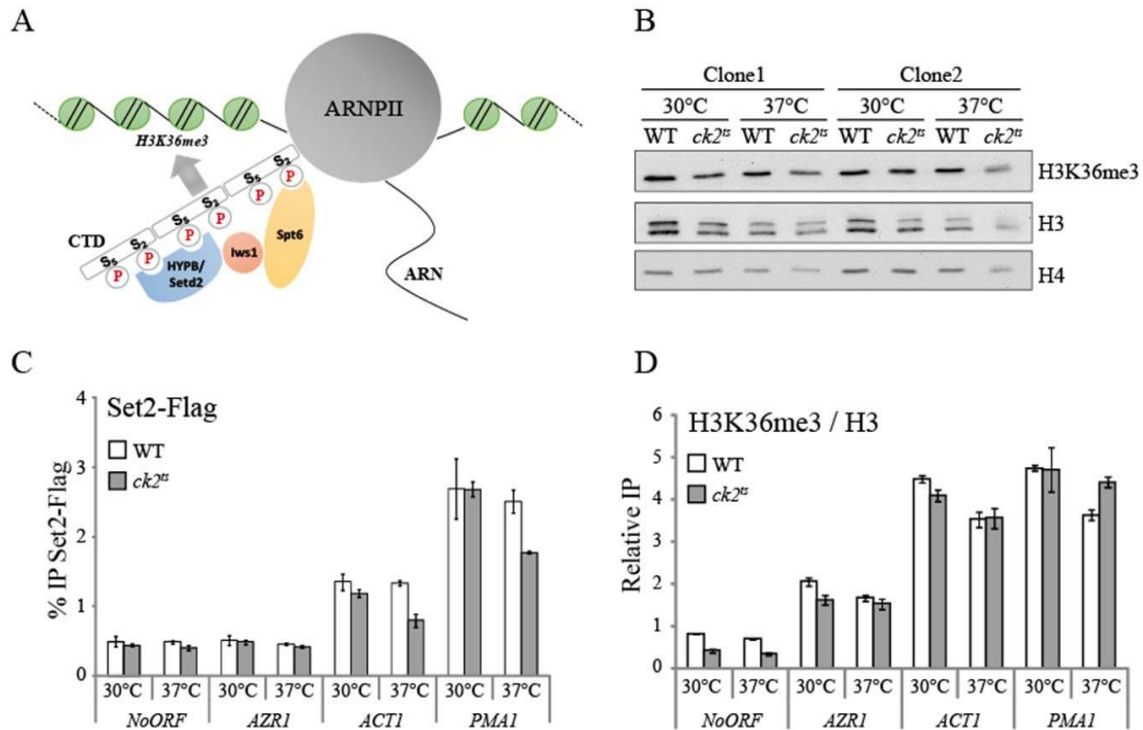


Figure 3.8 : Le dépôt d'H3K36me3 par Set2 dans les régions codantes est indépendant de CK2
A- Représentation schématique du modèle selon lequel, dans les cellules de mammifères, Spt6 favorise le recrutement co-transcriptionnel de Set2 au CTD via son partenaire Iws1. Le complexe Spt6-Iws1 régulerait ainsi le dépôt de la marque de triméthylation d'H3K36 dans le sillage de l'ARNPII en élongation. **B-** Analyse des protéines issues d'extraits totaux des mêmes souches que 7B-, WT et *ck2^{ts}*, à 30°C et 2h à 37°C. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE puis analysées par immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre H3K36me3, H3 et H4. Les résultats de deux clones indépendants sont représentés. **C-** ChIP Set2-Flag sur des chromatines extraites de souches WT ou *ck2^{ts}* exprimant Set2-Flag à 30°C et après un choc thermique 2h37°C. L'association de Set2 à la chromatine a été analysée par qPCR aux gènes transcrits *PMA1* et *ACT1*, au gène non transcrit *AZRI* ainsi qu'à la région intergénique non transcrite *NoORF* qui sert de contrôle. **D-** Évaluation par ChIP de la quantité relative à H3 total d'H3K36me3 réalisés sur des chromatines extraites des même souches WT ou *ck2^{ts}* que 7C- à 30°C et après un choc thermique 2h37°C. L'occupation de H3 et H3K36me3 a été analysée par qPCR aux gènes transcrits *PMA1* et *ACT1*, au gène non transcrit *AZRI* ainsi qu'à la région contrôle *NoORF*. Les résultats représentés correspondent à la normalisation par ratio à chaque locus des pourcentages d'IP de H3K36/H3. Les valeurs indiquées représentent la moyenne et l'erreur standard de trois expériences indépendantes.

3.5.7. CK2 maintien l'organisation de la chromatine au cours de la transcription par des mécanismes alternatifs à la régulation de Spt6.

Nous avons mis en évidence dans le chapitre 2 que CK2 est d'une importance critique dans le maintien de la justesse et de la précision de la transcription par l'ARNPII, via notamment la régulation de la stabilité de Spt6. Notre investigation sur un éventuel lien entre CK2 et la voie Set2-H3K36me3, cruciale dans la suppression de la transcription cryptique, n'a pas permis de mettre en évidence une régulation claire par CK2 dans ce contexte. CK2 est néanmoins une kinase pléiotropique qui possède un grand nombre de substrats impliqués dans la régulation de la transcription et de la chromatine.

La comparaison des données de séquençage à haut débit des ARN de souches *ck2^{ts}* et *spt6 7S-A* présentées dans le chapitre 2 suggère que la phosphorylation de Spt6 n'est pas l'unique voie d'action de la kinase, qui régulerait de façon multifactorielle la chromatine et la fidélité transcriptionnelle. Ceci est directement illustré par l'analyse du bruit de fond transcriptionnel. En effet, certaines régions génomiques font l'objet d'une activation de la transcription antisens dans *ck2^{ts}* mais pas dans le mutant non phosphorylable *spt6 7S-A*. A ce titre, les données de séquençage des ARN dans un locus du chromosome XIII montrent en effet une accumulation de transcrits antisens sur les gènes *FMP42* et *UBP8* dans le mutant *ck2^{ts}* mais pas dans le mutant *spt6 7S-A* (Fig. 3.9A).

Sur une analyse globale de l'ensemble du transcriptome, ce phénomène se traduit par une élévation plus importante du ratio antisens/sens dans *ck2^{ts}* que *spt6 7S-A* (Fig. 3.9B-C). On constate en effet que la densité de distribution pour le mutant *spt6 7S-A* du ratio antisens/sens de l'ensemble des gènes est intermédiaire entre le WT et *ck2^{ts}* (Fig. 3.9B). De façon comparable, lorsque le ratio antisens/sens des mutants est normalisé à celui du contrôle pour chaque gène, la densité de distribution de l'enrichissement antisens du mutant *ck2^{ts}* indique une accumulation plus importante de transcrits antisens dans *ck2^{ts}* que *spt6 7S-A*, qui semble donc en partie indépendante de la régulation de Spt6 (Fig. 3.9C). Ainsi, CK2 permet de limiter la transcription opportuniste en régulant d'une part la fonction de Spt6, mais également par une ou plusieurs voies alternatives.

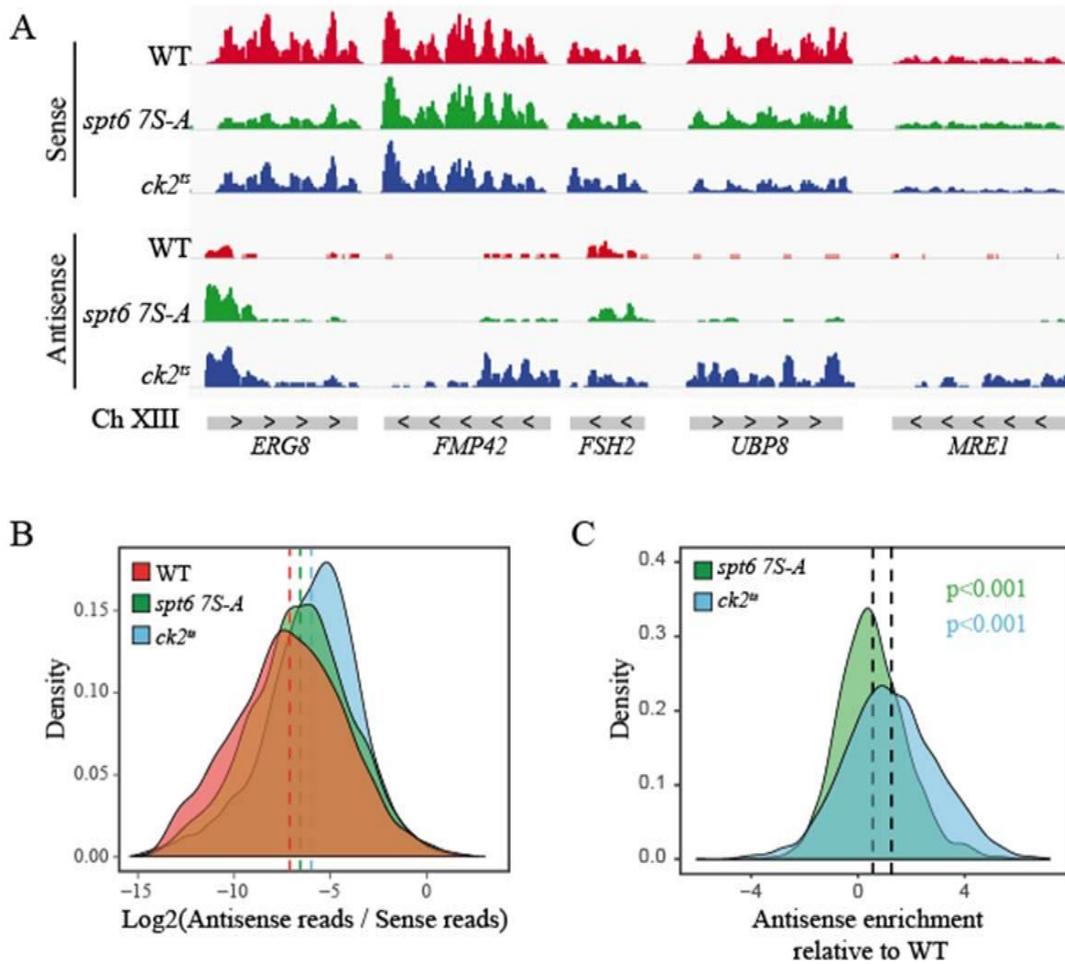


Figure 3.9 : CK2 réprime la transcription cryptique via d'autres voies que la régulation de Spt6

Séquençage à haut débit des ARN totaux issus de souches WT, *ck2^{ts}* ou *spt6 7S-A*. **A-** Instantané de la répartition du signal sens et antisens détecté par séquençage à haut débit des ARN dans les souches indiquées à un locus du chromosome XIII. **B-** Densités de distribution du Log2 du ratio (Antisense reads / Sense reads) pour le WT et les mutants *ck2^{ts}* et *spt6 7S-A*. **C-** Densités de distribution de l'enrichissement en transcrits antisens des mutants *ck2^{ts}* et *spt6 7S-A* par rapport au WT. Les médianes sont représentées en pointillés.

3.5.8. CK2 module de façon globale le recrutement aux gènes de l'ARNPII

L'élévation globale du bruit de fond transcriptionnel dans les mutants *ck2^{ts}* et *spt6 7S-A* devrait avoir des répercussions observables sur les profils d'occupation de l'ARNPII. Au cours de nos analyses, nous avons remarqué que l'absence de CK2 conduit à une hausse du niveau de complexe transcriptionnel dans les régions codantes, cohérente avec une accumulation de transcrits aberrants (Fig. 3.7C). Nous avons donc voulu approfondir notre compréhension de ce phénomène.

Pour cela, nous avons réalisé une nouvelle expérience de ChIP dirigé contre la sous-unité Rpb1 de l'ARNPII, que nous avons dans un premier temps analysé par qPCR. Le niveau de Rpb1 aux gènes *ACT1* et *PMA1* est en effet significativement plus élevé dans les mutants *ck2^{ts}* par rapport au WT, traduisant une augmentation de l'occupation de l'ARNPII sur les régions transcrites (Fig. 3.10A). Afin d'étudier cela de façon globale sur l'ensemble du génome, nous avons ensuite analysé ces ChIP par séquençage à haut débit. L'analyse en ChIP-seq révèle une augmentation de l'occupation de l'ARNPII à de nombreux gènes comme par exemple *GRE3*, *BTN2* et *GLK1* en absence de CK2 (Fig. 3.10B). Cependant le profil d'occupation sur la moyenne de l'ensemble des gènes traduit une tendance à l'augmentation générale d'ARNPII aux régions codantes dans *ck2^{ts}* sans pour autant mettre en évidence une différence clairement marquée (Fig. 3.10C). De manière intéressante, lorsqu'on sépare l'ensemble des gènes en 10 groupes en fonction du niveau d'ARNPII, il apparait que pour les gènes faiblement ou moyennement transcrits, l'occupation de Rpb1 augmente dans les mutants *ck2^{ts}* (Fig. 3.S2). En revanche, le groupe des gènes les plus fortement transcrits exhibe à l'inverse une diminution générale du recrutement d'ARNPII, ce qui explique que la différence entre WT et *ck2^{ts}* ne soit pas très marquée sur le metagène de la figure 3.10C qui représente la totalité du génome. Pour finir, nous avons voulu évaluer en quelles proportions l'augmentation du niveau d'ARNPII aux régions codantes se répercute sur la production des ARNm correspondants. Nous avons donc quantifié les ARNm de *PMA1* et *ACT1* par RTqPCR. *FLO8-3'* est utilisé comme contrôle positif étant donné qu'on sait que le transcrit court correspondant à la portion 3' de *FLO8* est fortement accumulé dans les mutants *ck2^{ts}* suite à l'activation du promoteur cryptique intragénique (Fig. 3.10D). Nos résultats de RTqPCR confirment que l'ARN *FLO8-3'* est enrichi en

absence de CK2 alors que la quantité d'ARNm de *PMA1* et *ACT1* est similaire dans les cellules WT et *ck2^{ts}* à 37°C ou tend même à diminuer à 30°C. Ainsi, l'ARNPII excédentaire sur ces deux gènes ne permet pas une transcription plus efficace des ARNm correspondants (Fig. 3.10D).

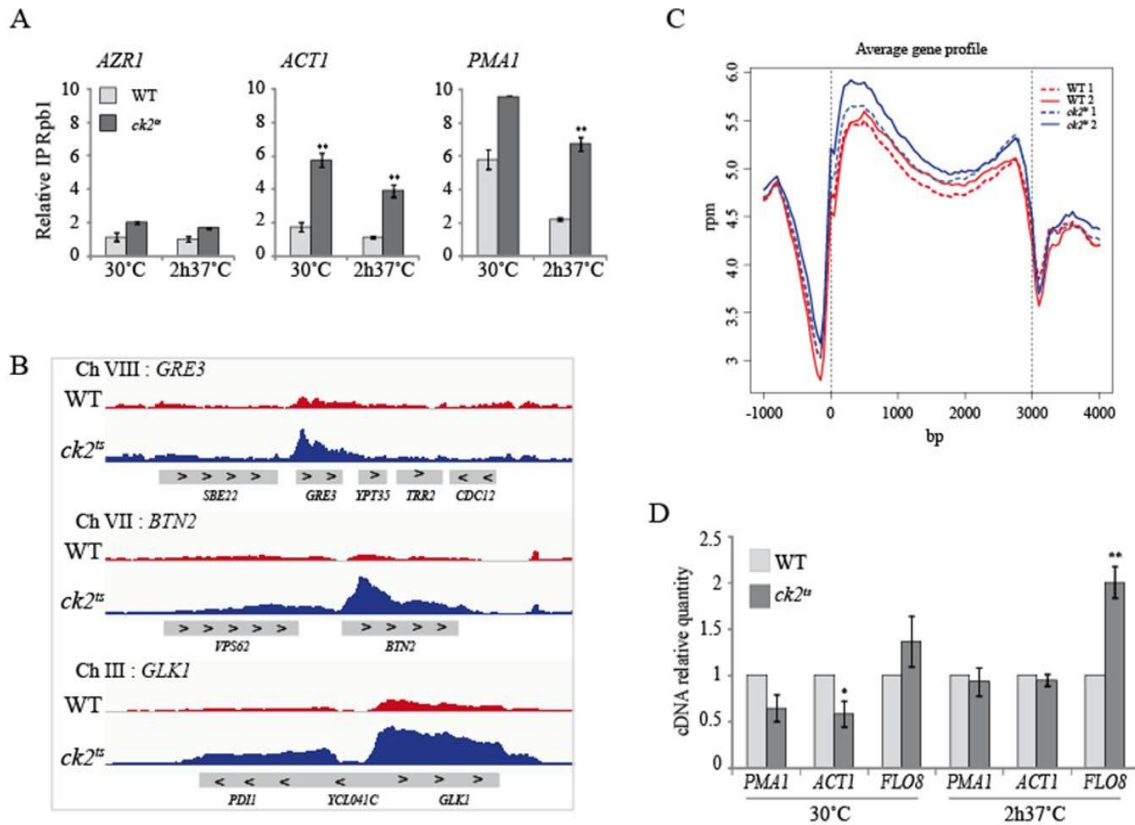


Figure 3.10 : Le niveau d'ARNPII augmente aux régions codantes en absence de CK2

A- ChIP Rpb1 sur des chromatines extraites de cellules WT et *ck2^{ts}*, arrêtées en phase G1 récoltées à 30°C et après 2h à 37°C, et analysées par qPCR aux gènes constitutivement transcrits *ACT1* et *PMA1* et au gène non transcrit *AZR1*. Les données sont normalisées par rapport au niveau de Rpb1 à la région intergénique contrôle *NoORF* (chromosome V). **B-** Données issues d'une analyse de ChIP-Seq dirigée contre Rpb1 dans des cellules WT et *ck2^{ts}* récoltées après 1h à 37°C et arrêtées en phase G1. Les instantanés de l'occupation de Rpb1 présentent un enrichissement dans *ck2^{ts}* par rapport au contrôle à 3 loci différents des chromosomes VIII (*GRE3*), VII (*BTN2*) et III (*GLK1*). **C-** Metagène représentant l'occupation de Rpb1 sur la moyenne de l'ensemble des régions codantes alignées par rapport au TSS et au TTS pour 2 clones WT et 2 clones *ck2^{ts}*. **D-** Évaluation par RT-qPCR de la quantité d'ARNm dans des cellules WT et *ck2^{ts}*. Les ARN totaux sont extraits à 30°C et après 2h à 37°C, reverse transcrit en cDNA puis quantifiés par qPCR à *PMA1*, *ACT1* et *FLO8-3'*. Le niveau relatif correspond au ratio de chaque ARNm normalisé sur le niveau de *SCR1*. *FLO8-3'* est utilisé comme contrôle positif.

3.5.9. CK2 module la phosphorylation du CTD sur les sérines 2

Lors de la transcription, l'état de phosphorylation du CTD de l'ARNPII est modulé, ce qui participe à la coordination des facteurs et des fonctions liés à la progression de la machinerie transcriptionnelle. L'état de phosphorylation du CTD est donc couramment étudié car il traduit la phase transcriptionnelle dans laquelle évolue l'ARNPII. De façon simplifiée, la phosphorylation des sérines 5 du CTD traduit les phases précoces du cycle transcriptionnel alors que la phosphorylation des sérines 2 reflète plutôt les polymérases engagées dans la phase d'élongation processive. Dans les mutants *ck2^{ts}*, nous avons observé une accumulation d'ARNPII à certains gènes qui ne s'accompagne pas d'une augmentation de la production de l'ARNm correspondant. Nous nous sommes donc questionnés sur l'état d'activation de l'ARNPII en absence de CK2.

Nous avons tout d'abord comparé les niveaux cellulaires totaux d'ARNPII phosphorylées sur les sérines 5 ou 2 par immunobuvardage. Le niveau total d'ARNPII Rpb1-pSer5 est similaire dans les cellules WT et *ck2^{ts}*. A l'inverse, le niveau global d'ARNPII Rpb1-pSer2 diminue notablement dans les mutants *ck2^{ts}* à 30°C et à 37°C (Fig. 3.11A). Ce résultat intéressant met en évidence un défaut général de la signalisation liée à l'élongation transcriptionnelle en absence de CK2. Ainsi, pour déterminer spécifiquement si CK2 influence l'état de phosphorylation de l'ARNPII à la chromatine, nous avons réalisé des ChIP dirigés respectivement contre Rpb1-pSer5 et pSer2. L'analyse aux régions transcrites *ACT1* et *PMA1* traduit une augmentation d'ARNPII pSer5 comparable à l'augmentation d'ARNPII, mais pas de variation du niveau d'ARNPII pSer2 dans les mutants *ck2^{ts}* (Fig. 3.S3). Nous avons normalisé ces résultats de ChIP par rapport à l'enrichissement de Rpb1 total à la chromatine. Le ratio Rpb1-pSer5/Rpb1 à *ACT1* indique une tendance à la diminution dans les mutants *ck2^{ts}* de la phosphorylation sur les sérines 5. Au niveau du gène *PMA1*, aucune différence n'est à noter (Fig. 3.11B). Le ratio Rpb1-pSer2/Rpb1 traduit quant à lui une diminution significative de l'enrichissement en ARNPII pSer2 par rapport au niveau d'ARNPII total aux gènes *ACT1* et *PMA1* (Fig. 3.11C).

Ces observations suggèrent fortement que l'excédent d'ARNPII qui occupe les régions codantes dans les mutants *ck2^{ts}* n'est pas phosphorylé sur les sérines 2 du CTD. Ces ARNPII surnuméraires ne sont donc pas dans un état d'activation transcriptionnel

canonique qui reflète habituellement la phase d'élongation processive. Il semble qu'un nombre important de complexes transcriptionnels non productifs soit présent à la chromatine puisque le niveau d'ARNm reste globalement inchangé.

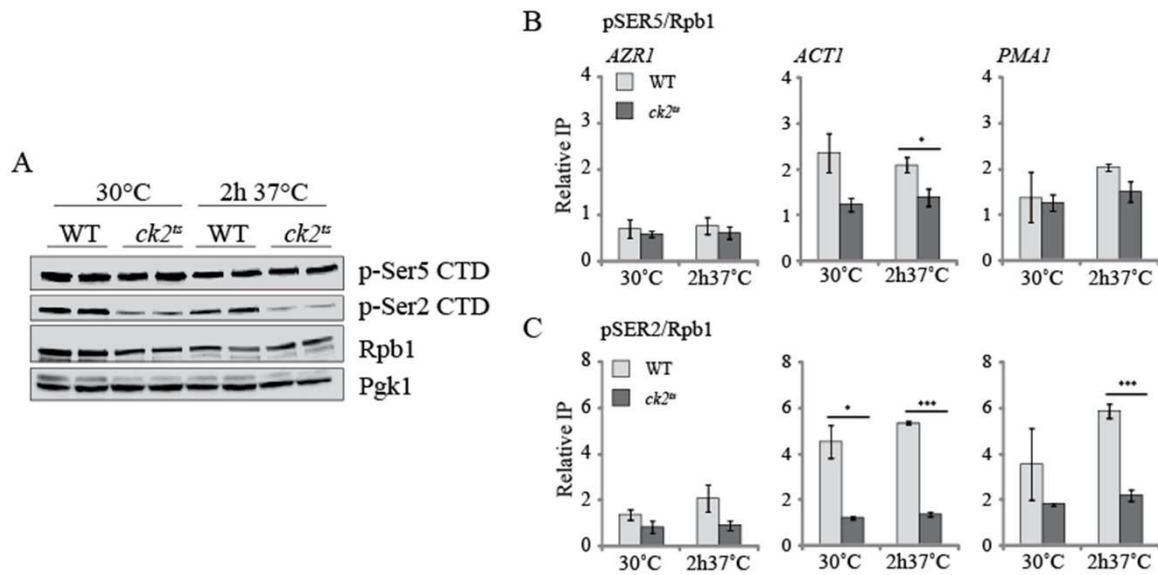


Figure 3.11 : CK2 est impliquée dans la modulation de la phosphorylation de la sérine 2 du CTD

A- Analyse du niveau de phosphorylation du CTD sur les sérines 5 et 2 à partir d'extraits totaux issus de cellules WT et *ck2^{ts}* récoltées à 30°C ou après 2h à 37°C. L'immunobuvardage a été réalisé avec des anticorps dirigés p-Ser5 CTD, p-Ser2 CTD, Rpb1 total, et Pgk1 est utilisé comme contrôle de dépôt. **B- C-** Ratios du niveau de Rpb1 phosphorylée respectivement sur les sérines 5 et 2 par rapport au niveau total de Rpb1, évalué par ChIP sur des chromatines issues de souches WT et *ck2^{ts}* récoltées à 30°C et après 2h à 37°C. Les analyses par qPCR ont été réalisées aux gènes transcrits constitutivement *ACT1* et *PMA1*, au gène non transcrit *AZR1* et normalisé à la région contrôle intergénique *NoORF*.

3.5.10. La modulation de pSer2 dans les mutants *ck2^{ts}* est indépendante de Spt6.

Ctk1 est la principale kinase responsable de la phosphorylation du CTD sur les sérines 2. Il est démontré qu'au cours de la transcription, Ctk1 et Spt6 sont recrutés de façon concomitante (Mayer et al., 2010). De plus, il semble que Ctk1 et Spt6 soient physiquement associés et que leurs fonctions soient interdépendantes dans le processus de

phosphorylation du CTD (Dronamraju and Strahl, 2014). Il est en outre proposé que la stabilité des protéines Ctk1 et de Spt6 repose mutuellement l'une sur l'autre (Dronamraju and Strahl, 2014), ce qui toutefois a été remis en question par une autre publication (Burugula et al., 2014). Nous avons montré dans le chapitre 2 que la phosphorylation de Spt6 par CK2 influence la stabilité de la protéine. Nous nous sommes donc demandé si cela pouvait ou non expliquer le défaut de phosphorylation des sérines 2 du CTD dans les mutants *ck2^{ts}*. Si tel est le cas, le niveau de pSer2 serait affecté dans un mutant *spt6 7S-A*, moins stable que Spt6 WT.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une expérience de ChIP dirigé contre Rpb1 dans des cellules exprimant les formes WT ou 7S-A non phosphorylable de Spt6. Nous n'avons observé aucune différence notable du niveau d'ARNPII aux régions transcrites *CLN3*, *PMA1* et *ACT1* à 30°C ou 37°C (Fig. 3.12A). De la même façon, un ChIP dirigé contre Rpb1-pSer2 sur les mêmes chromatines indique un niveau similaire d'ARNPII pSer2 aux régions transcrites *CLN3*, *PMA1* et *ACT1* à 30°C ou 37°C (Fig. 3.12B). Ainsi, il semble que l'état de phosphorylation de Spt6, qui influence au demeurant sa stabilité, n'affecte pas le niveau de Rpb1-pSer2 aux régions codantes qui ont été testées.

Les mutants *ck2^{ts}*, en plus de présenter un déficit cellulaire de Rpb1-pSer2, ont un niveau plus élevé d'ARNPII non phosphorylée aux régions transcrites. L'expression d'un mutant phosphomimétique *spt6 7S-D* dans des cellules *ck2^{ts}* ne restaure ni la diminution de Rpb1-pSer2 en immunobuvardage (Fig. 3.12D), ni l'élévation du niveau d'ARNPII dans les régions transcrites (Fig. 3.12C). Ainsi, l'élévation du niveau d'ARNPII aux régions codantes ainsi que son défaut de phosphorylation sur les sérines 2 du CTD dans les cellules *ck2^{ts}* ne dépend pas de la régulation de la stabilité de Spt6 par CK2. On peut donc conclure que le déficit de pSer2-CTD dans les mutants *ck2^{ts}* n'est pas dû à la dérégulation de Spt6 mais passe par une voie alternative.

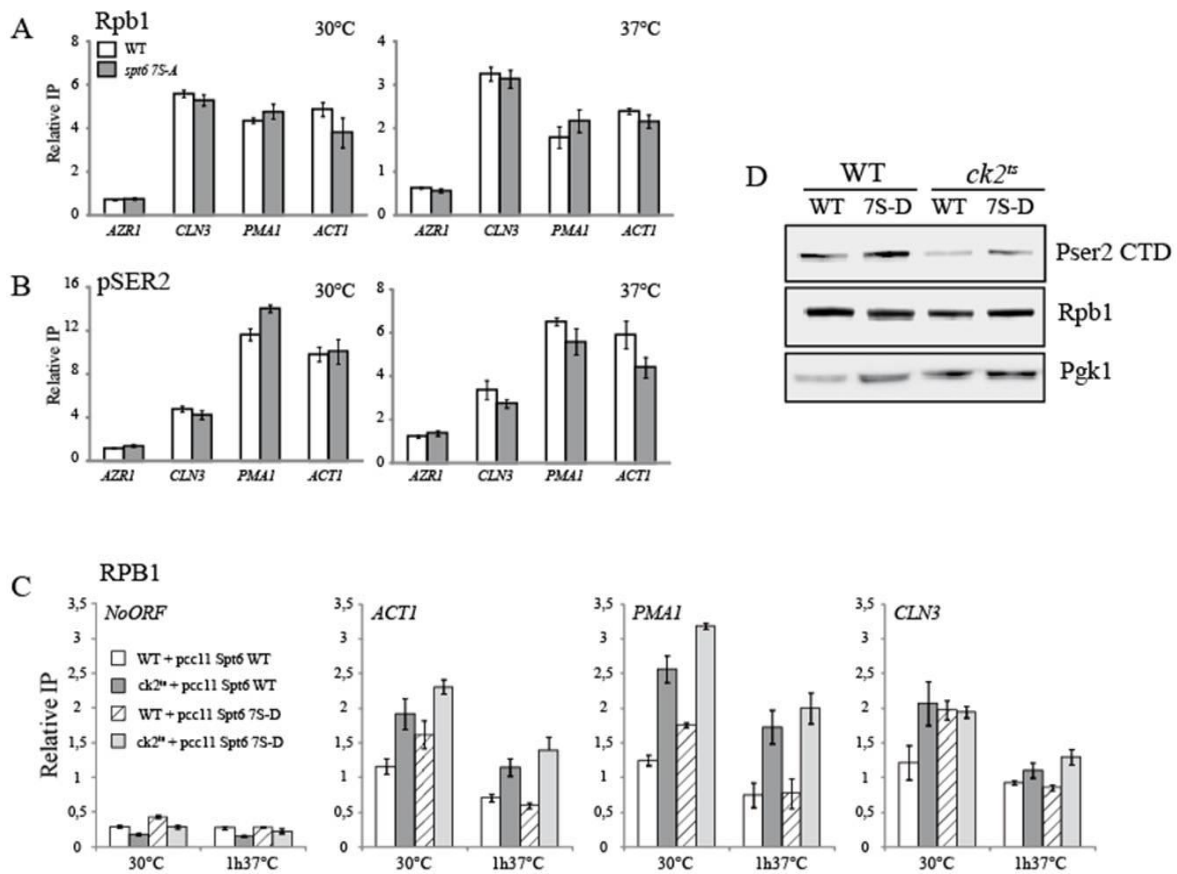


Figure 3.12 : La modulation de pSer2 par CK2 est indépendante de la phosphorylation de Spt6

A- B- ChIP Rpb1 et pSer2 CTD sur des chromatines issues de souches $\Delta spt6$ compensé par un vecteur d'expression qui code pour Spt6 WT ou *spt6 7S-A*, récoltées à 30°C ou après 2h à 37°C. Les analyses sont réalisées par qPCR aux gènes transcrits *CLN3*, *PMA1* et *ACT1* ainsi qu'au gène non transcrit *AZR1* puis normalisées par rapport à l'enrichissement en Rpb1 à la région contrôle intergénique *NoORF*. **C-** Le mutant phosphomimétique *spt6 7S-D* ne supprime pas l'élévation du niveau de Rpb1 dans les régions codantes des mutants *ck2^{ts}*. ChIP évaluant le niveau de Rpb1 dans des cellules WT et *ck2^{ts}* en phase G1 du cycle cellulaire. Les cellules expriment Spt6 WT ou le mutant phosphomimétique *spt6 7S-D* et sont récoltées à 30°C ou 1h37°C. Les analyses sont réalisées par qPCR aux gènes transcrits *ACT1*, *PMA1* et *CLN3* et à la région contrôle intergénique *NoORF*. **D-** Analyse du niveau cellulaire total de pSer2-CTD par immunobuvardage sur des extraits totaux de souches WT ou *ck2^{ts}* portant un vecteur qui exprime soit SPT6 WT soit *spt6 7S-D* phosphomimétique et récoltées après 2h à 37°C. L'immunobuvardage est réalisé avec des anticorps dirigés contre pSer2-CTD, Rpb1 et Pgk1 est utilisé comme contrôle de dépôt.

Le rôle de Spt6 dans la régulation de la phosphorylation de la sérine 2 du CTD intervient dans une voie régulée en amont par le complexe PAF. PAF a initialement été identifié chez *S. cerevisiae* comme interagissant avec l'ARNPII. Il est composé de 5 sous-unités incluant

Paf1, Ctr9, Cdc73, Leo1, and Rtf1 et joue un rôle dans les différentes phases transcriptionnelles (Jaehning, 2010). PAF est également impliqué dans le contrôle de la modification des histones au cours de l'élongation de la transcription comme la monoubiquitination de H2B et le dépôt de H3K36me3 (Tomson and Arndt, 2013). Il a récemment été montré que CK2 phosphoryle plusieurs membres du complexe PAF et pourrait ainsi avoir une incidence positive sur la monoubiquitination d'H2B (Bedard et al., 2016). Dans le même temps, il est suggéré que CK2 module H2Bub en régulant négativement la fonction de sa déubiquitinase Ubp8 (Basnet et al., 2014). L'ensemble de ces données nous a incité à investiguer si CK2 régule les fonctions de PAF dans le processus de phosphorylation de la sérine 2 du CTD.

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si le mutant conditionnel que nous utilisons, *ck2^{ts}*, présente un phénotype qui concorde avec les données de la littérature concernant l'ubiquitination de H2B. Pour cela, nous avons utilisé des souches WT ou *ck2^{ts}* exprimant H2B-Flag. La molécule d'ubiquitine étant d'un poids moléculaire d'environ 8 KDa, les formes non- ou monoubiquitinées d'H2B-Flag pourront être discriminées par séparation sur gel SDS-PAGE. Une souche *Δubp8* est utilisée comme contrôle positif puisqu'elle présente une accumulation de H2Bub. L'analyse par immunobuvardage des extraits issus des souches WT, *ck2^{ts}* et *Δubp8* montre, comme attendu, que le niveau d'H2B-Flag monoubiquitinée est plus important dans le contrôle positif *Δubp8*, mais est plus faible dans le mutant *ck2^{ts}*, à 37°C que dans le WT (Fig. 3.13A). Ainsi, en accord avec la littérature, l'inactivation de la fonction de CK2 s'accompagne d'une altération du niveau d'H2Bub. Cette observation et la phosphorylation massive de plusieurs sous-unités de PAF par CK2 en font une voie d'intérêt dans la compréhension de la régulation de l'élongation transcriptionnelle par CK2. Afin d'apprécier les éventuelles interactions génétiques entre CK2 et PAF, nous avons réalisé un test de croissance comparé des souches WT, *ck2^{ts}*, *ck2^{ts}/Δcdc73* et *Δcdc73* (Fig. 3.13B). Les souches *ck2^{ts}* et *Δcdc73* présentent toutes deux un retard de croissance similaire par rapport au WT. Mais le double mutant affiche un phénotype plus marqué, soulignant l'interaction génétique entre PAF et CK2, dont on sait qu'ils interviennent tous deux au cours de l'élongation de la transcription.

Les mutants *Δcdc73* ou *Δpaf1* ont un niveau d'ARNPII pSer2 amoindri (Dronamraju and Strahl, 2014). Malheureusement nous n'avons pas été en mesure de répéter ce résultat (Fig.

3.13C). Les souches utilisées pour ces analyses dans la littérature dérivent du fond génétique D273-10B alors que nous travaillons avec des souches issues du fond génétique S288C, ce qui pourrait expliquer ces différences surprenantes. Étonnamment, l'analyse du niveau de pSer2 dans des doubles mutants *ck2^{ts}/Δcdc73* ou *ck2^{ts}/Δpaf1* montre une restauration du signal de l'ARNPII pSer2 similaire au WT, suggérant un antagonisme des fonctions de PAF et CK2 (Fig. 3.13C). A défaut d'une altération de la phosphorylation de la sérine 2 dans les mutants affectant la fonction du complexe PAF, la triméthylation d'H3K36 est quant à elle clairement altérée. Le mutant *Δcdc73* présente une diminution d'au moins 2 fois du signal d'H3K36me3 et *Δpaf1* une perte totale du signal H3K36me3 (Fig. 3.13C).

De manière intéressante, le double mutant *ck2^{ts}/Δpaf1* présente également une restauration partielle du signal H3K36me3, contrairement au double mutant *ck2^{ts}/Δcdc73*, ce qui suggère à nouveau un antagonisme fonctionnel entre CK2 et PAF. Ces données nous confortent dans l'idée que le dépôt d'H3K36me3 n'est pas affecté en absence de CK2. Toutefois, la restauration du signal de pSer2 et H3K36me3 indique une relation complexe entre CK2 et PAF. On peut d'une part imaginer une régulation indirecte par CK2 de voies de compensation qui interviennent dans la régulation de ces mécanismes. D'autre part, CK2 phosphoryle directement plusieurs sous-unités du complexe PAF et régule possiblement leur fonction. Ainsi, son invalidation combinée soit à la délétion de *CDC73*, soit à celle de *PAF1* pourrait se traduire d'une façon inattendue quant aux mécanismes régulés. La relation entre CK2 et PAF nécessitera donc une investigation approfondie afin de comprendre les liens fonctionnels qui les relient.

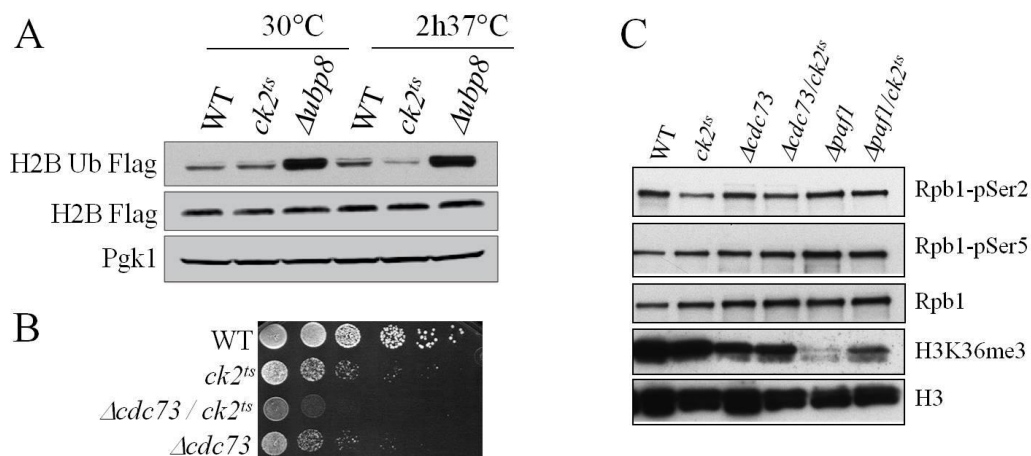


Figure 3.13 : Interaction génétique et fonctionnelle entre CK2 et le complexe PAF

A- Extraits protéiques totaux de souches WT, *ck2^{ts}* et *Δubp8* exprimant H2B-Flag à 30°C et après 2h à 37°C, analysés par immunobuvardage. Le retard de migration de la forme ubiquitinée d'H2B-Flag permet de discriminer sur un même gel H2B-Flag Ub et H2B-Flag avec un anticorps dirigé contre l'épitope Flag. Pgk1 est utilisé comme contrôle. **B-** Test de croissance par dilution en série de souche WT, *ck2^{ts}*, *Δcdc73* et *Δcdc73/ck2^{ts}* sur YPD à 30°C. **C-** Extraits protéiques totaux de souches WT, *ck2^{ts}*, *Δcdc73*, *Δcdc73/ck2^{ts}*, *Δpaf1* et *Δpaf1/ck2^{ts}*, à 30°C et après 2h à 37°C. Les échantillons sont séparés sur gel SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage avec des anticorps spécifiques de Rpb1-pSer2, Rpb1-pSer5, Rpb1, H3K36me3 et H3 total.

3.6. Discussion

Les travaux du laboratoire ont démontré que les chaperons d'histones Spt2 (Bhat et al., 2013) et Spt6 (Chapitre 2) sont phosphorylés par CK2, ce qui régule leur fonction d'organisation de la chromatine lors de l'élongation transcriptionnelle. La régulation de Spt6 par CK2 participe plus particulièrement au maintien du programme transcriptionnel en limitant les erreurs de l'ARNPII liées à des défauts de structure chromatinienne. Cependant, CK2 possède un grand nombre de substrats avérés ou potentiels impliqués dans la régulation de la transcription et de la chromatine, ce qui complexifie la compréhension de sa signalisation dans ce contexte.

Dans le chapitre 3 nous avons cherché à identifier des mécanismes alternatifs régulés par CK2 dans le cadre du maintien de la chromatine lors de l'élongation de la transcription. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'impact d'une perte de fonction de CK2 sur la stabilité et les fonctions du complexe Spt6-Iws1, ainsi que sur la voie Set2-H3K36me3, également cruciale dans la suppression de la transcription cryptique.

Nous avons montré que CK2 phosphoryle le principal partenaire de Spt6, Iws1. Les analyses de la régulation par CK2 du complexe Spt6-Iws1 ont mis en lumière que seule la phosphorylation de Spt6 semble fondamentale pour la reconstitution de la chromatine suite à la transcription. La phosphorylation d'Iws1 sur la sérine 89 n'apparaît pas comme une modification essentielle aux fonctions de la protéine dans ce contexte alors que la phosphorylation de Spt6 par CK2 favorise très clairement la formation du complexe Spt6-Iws1 *in vitro*. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons cependant pas été en mesure de démontrer formellement son incidence sur leur interaction *in vivo*, ni sur leur

recrutement aux régions codantes. En revanche, l'absence de CK2 provoque une augmentation globale de l'occupation de l'ARNPII, Spt6 et Iws1 sur les gènes faiblement ou moyennement transcrits, qui n'est pas accompagnée par une production accrue d'ARNm. Notre étude met en évidence un défaut de phosphorylation de la sérine 2 du CTD de la polymérase ainsi que de mono-ubiquitination de H2B, qui indique une influence de CK2 sur les voies de signalisation associées à l'élongation transcriptionnelle. Étant donné que le complexe PAF est impliqué dans ces deux mécanismes, nous avons initié l'investigation des interactions fonctionnelles entre PAF et CK2. Nos résultats suggèrent une interconnexion complexe de leur fonction qui influence l'élongation transcriptionnelle tant au niveau de la phosphorylation des sérines 2 du CTD de l'ARNPII, que la triméthylation d'H3K36. Une étude plus approfondie sera nécessaire pour clarifier ces voies de régulation.

3.6.1. La phosphorylation de Iws1 par CK2 ne semble pas intervenir dans la maintenance de la structure de la chromatine au cours de l'élongation transcriptionnelle.

Iws1 est directement phosphorylé par CK2 dans sa région N-terminale. La sérine 89 et la thréonine 86, situées dans une région consensus de CK2 riche en résidus acides, sont toutes deux phosphorylées suite à un essai de phosphorylation *in vitro* (Fig. 3.2). Cependant seule la sérine 89 est identifiée comme étant phosphorylée *in vivo* par une analyse en spectrométrie de masse (Fig. 3.1). De façon intéressante, les domaines N-terminaux de Spt6 et Iws1 sont phosphorylés par CK2 et le facteur d'élongation Spt5 possède également un site consensus de CK2 phosphorylé *in vivo* sur la sérine 188 (Krogan et al., 2002). Ainsi, Spt6, Iws1 et Spt5 possèdent des domaines N-terminaux riches en résidus acides qui sont des cibles avérées ou potentielles de CK2. Les domaines de Spt5 et Iws1 qui portent le site consensus de CK2 partagent en outre une forte homologie de séquence (Fig. 3.14). Ces facteurs sont deux interacteurs de Spt6, et il a déjà été proposé que la phosphorylation par CK2 puisse être un mode de modulation de leur interaction. Cela nourrit l'hypothèse selon laquelle CK2 est impliquée dans l'organisation de la chromatine au cours de l'élongation de manière complexe, en phosphorylant et régulant la fonction de multiples facteurs. De plus,

une publication récente a mis en évidence le rôle fondamental de Spt5 dans la suppression de la transcription antisens chez *S. pombe* (Shetty et al., 2017). Nos analyses démontrent que de nombreux transcrits antisens accumulés dans les mutants *ck2^{ts}* ne sont pas dépendants de la régulation de Spt6. Ainsi, on peut imaginer une phosphorégulation de Spt5, CK2-dépendante, qui interviendrait dans la modulation de ses fonctions liées à la suppression de la transcription antisens. Il sera donc intéressant d'investiguer les liens entre CK2 et Spt5 dans ce contexte au cours d'études futures.



Figure 3.14 : Comparaison d'une partie de la séquence peptidique d'Iws1 et Spt5 de levure
 Cette région possède une importante homologie entre les deux protéines et le site consensus de CK2 encadré en rouge fait l'objet d'une phosphorylation in vivo sur les sérines 89 et 188 pour Iws1 et Spt5 respectivement (flèche).

Concernant la phosphorylation d'Iws1 proprement dite, l'analyse phénotypique des mutants de phosphorylation de Iws1 n'a mis en évidence aucun phénotype *SPT-* ou cryptique au gène *FLO8* (Fig. 3.5). La phosphorylation d'Iws1 par CK2 n'est donc pas essentielle à ses fonctions associées à la reconstitution de la structure de la chromatine lors de l'élongation. Iws1 et Spt6 coopérant étroitement, il était logique de penser que l'absence de phosphorégulation coexistante de ces deux facteurs puisse avoir un effet plus délétère sur leurs fonctions. La combinaison des mutants de phosphorylation d'Iws1 et Spt6 n'entraîne pourtant pas d'aggravation des phénotypes déjà identifiés. Ainsi, nos résultats indiquent que le rôle de CK2 dans la reconstitution de la chromatine après le passage de la machinerie transcriptionnelle via Spt6-Iws1 passe essentiellement par la phosphorylation du facteur Spt6. Iws1 possède des fonctions indépendantes de Spt6, notamment dans l'initiation transcriptionnelle de certains gènes ainsi que dans la maturation et l'export des ARNm. En 2010, une étude à large échelle a mis en évidence que les profils de recrutement d'Iws1, Elf1 et le facteur de polyadénylation Pcf11 sont comparables (Mayer et al., 2010). Elf1 est également cible de CK2 (Prather et al., 2005), et Pcf11 co-purifie avec la kinase (Gavin et al., 2002). Il est donc possible que la phosphorylation de la sérine 89 par CK2 ait un rôle fonctionnel dans ce contexte. Il serait intéressant d'étudier le rôle de la phosphorylation

d'Iws1 dans les processus de maturation et d'exportation des ARNm. À cet effet, il est important de souligner que le facteur Spt5 possède un rôle important dans ces processus (Lindstrom et al., 2003; Mayer et al., 2012). Par le biais de la phosphorylation d'Iws1, CK2 pourrait donc intervenir dans le contrôle des étapes menant à la production des ARNm matures autres que l'élongation. Des études ultérieures sont nécessaires pour permettre de tester cette hypothèse

3.6.2. CK2 influence l'interaction Spt6-Iws1 *in vitro* via la phosphorylation de Spt6.

L'interaction de Spt6 avec Iws1 est essentielle chez la levure (McDonald et al., 2010). Il est notamment proposé dans la littérature que la formation de ce complexe permettrait de réguler par compétition l'interaction entre Spt6 et les nucléosomes, favorisant ainsi la libération de Spt6 de la chromatine après le passage de l'ARNPII (McDonald et al., 2010). Des données préliminaires du laboratoire ont montré que la phosphorylation par CK2 de Spt6 stimule son interaction avec Iws1 *in vitro* (Annexe 1-B). De plus, un mutant phosphomimétique 6xHis-Spt6 7S-D interagit plus stablement avec GST-Iws1 (Annexe 1-C). A contrario, la phosphorylation *in vitro* d'Iws1 et les mutants de phosphorylation (Iws1-3A/3D) n'ont quant eux aucune influence. Une nouvelle fois, seule la phosphorylation de Spt6 semble importante pour la modulation du complexe.

Nous nous attendions donc à ce que l'interaction Spt6-Iws1 soit altérée dans les mutants *ck2^{ts}*. Pourtant, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence un effet délétère de l'absence de CK2 dans les expériences de co-immunoprécipitation *in vivo* des deux partenaires (Fig. 3.4). Dans ce contexte, il est important de considérer que la quantité de protéine Flag-Spt6 dans les extraits totaux des mutants *ck2^{ts}* est largement diminuée par rapport au WT ce qui illustre bien le déficit de stabilité de la protéine lorsqu'elle n'est pas phosphorylée (Fig. 3.4). Malgré cette variation dans la stœchiométrie de Spt6, l'interaction Spt6-Iws1 apparait comparable dans le WT et le mutant. Ce constat suggère que c'est la fraction non complexée de Spt6 qui est plus susceptible à l'instabilité en absence de CK2. L'interaction avec Iws1 pourrait en effet avoir un rôle stabilisateur sur la protéine. De plus, étant donné la nature essentielle de l'existence du complexe, il est possible d'imaginer *in*

in vivo des voies de compensation qui tendent à maintenir l'interaction Spt6-Iws1 hyper-stable en réponse au déficit de protéine Spt6, pour en protéger les fonctions essentielles. Ceci pourrait constituer une piste afin de réconcilier les observations issues de nos analyses *in vitro* et *in vivo*.

3.6.3. La déplétion de CK2 affecte indirectement l'occupation de Spt6-Iws1 aux régions transcrites via une élévation globale du niveau d'ARNPII.

Même s'il existe certaines différences dans les profils de recrutements de Spt6 et Iws1 sur les gènes transcrits (Mayer 2010), les deux membres du complexe dépendent néanmoins fortement l'un de l'autre. En effet, il est montré qu'un défaut fonctionnel d'Iws1 affecte le recrutement de Spt6 au promoteur du gène *CYC1* (Fischbeck et al., 2002; Zhang et al., 2008). De façon moins anecdotique, la perte de fonction de Spt6 altère le recrutement d'Iws1 aux régions transcrites (Fig. 3.S1).

La mutation des sites cibles de CK2 sur Spt6 altère la fonction de la protéine sans pour autant affecter son recrutement, ni celui d'Iws1 aux gènes transcrits en conditions basales (Fig. 3.6). Par contre, une élévation du niveau de Spt6-Iws1 aux régions codantes accompagne une augmentation de l'occupation du niveau d'ARNPII dans les mutants *ck2^{ts}* (Fig. 3.7). Ainsi, CK2 semble avoir un effet indirect sur le recrutement du complexe en lui-même. De façon intéressante, l'analyse des niveaux relatifs de Spt6 et Iws1 par rapport à l'ARNPII (Rpb1) reflète un déficit de protéine Spt6 mais pas d'Iws1 dans des mutants *ck2^{ts}* aux gènes transcrits *PMA1* et *ACT1* (Fig. 3.7). Ces données sont cohérentes avec le fait que CK2 est important pour le maintien du niveau cellulaire de Spt6, mais nuancent la dépendance d'Iws1 vis-à-vis de son partenaire dans son processus de recrutement. Cette contradiction suggère la possibilité d'une compensation cellulaire par un recrutement alternatif d'Iws1 au-delà d'une hyper stabilité du complexe dans ces conditions. L'existence d'un complexe transcriptionnel réussissant l'ARNPII, Elf1, Pcf11 et Iws1 pourrait supporter cette idée (Mayer et al., 2010). D'autre part, certaines fonctions de Spt6 sont indépendantes du complexe avec Iws1. Alternativement, nos résultats peuvent donc suggérer que seule la fraction « libre » de Spt6, non complexé à Iws1 est régulée par CK2.

3.6.4. CK2 ne régule pas le processus de triméthylation d'H3K36 pour supprimer la transcription cryptique.

Chez les eucaryotes supérieurs, il a été démontré qu'Iws1 favorise le recrutement de la méthyltransférase SetD2 à la machinerie transcriptionnelle et le dépôt consécutif d'H3K36me3 (Yoh et al., 2007). Ce modèle propose qu'Iws1 fasse le lien entre Spt6 et SetD2 lors de l'élongation, afin de déposer correctement H3K36me3. A ce titre, le complexe Spt6-Iws1 permettrait de conserver l'état épigénétique des régions codantes, supprimant ainsi la transcription cryptique. Nos données *in vitro* révèlent clairement que la phosphorylation de Spt6 par CK2 stabilise l'interaction Spt6-Iws1. Notre hypothèse de départ était que CK2 pouvait moduler le complexe Spt6-Iws1 et avoir ainsi une influence sur le recrutement de Set2 et la triméthylation de H3K36me3 aux régions codantes lors de la transcription chez la levure. Les résultats de nos expériences indiquent une légère diminution du recrutement de Set2 à *PMA1* et *ACT1* à 37°C (Fig. 3.8) qui corrèle avec la baisse du ratio Spt6-Flag/Rpb1 aux mêmes loci en absence de CK2 (Fig. 3.7). Néanmoins le niveau relatif d'H3K36me3 à ces mêmes régions n'est pas altéré dans les mutants *ck2^{ts}*. Ainsi, l'ensemble de nos analyses invalide cette hypothèse. Nous pouvons donc conclure clairement que la suppression de la transcription cryptique par CK2 ne fait pas intervenir la modulation de la voie Set2-H3K36me3.

3.6.5. La maintenance chromatinienne dépendante de CK2 est multifactorielle.

Nos données de séquençage à haut débit des ARN issus de souches *ck2^{ts}* ou *spt6 7S-A* mettent en évidence que la transcription antisens est activée à certains loci dans les mutants *ck2^{ts}* mais pas dans le mutant non phosphorylable de Spt6 (Fig. 3.9). L'analyse comparative de l'enrichissement antisens pour l'ensemble des transcrits traduit en effet une plus forte accumulation du bruit de fond transcriptionnel en absence de CK2 qui souligne que la suppression CK2-dépendante de la transcription cryptique passe par au moins une autre voie de régulation que la phosphorylation de Spt6.

De manière intéressante, nous avons observé que les mutants *ck2^{ts}* présentent une élévation du niveau d'ARNPII aux gènes transcrits *PMA1* et *ACT1* mais pas le mutant *spt6 7S-A*

(Fig. 3.10-12). On peut envisager que le bruit de fond transcriptionnel accumulé dans ces mutants soit imputable aux polymérases surnuméraires. Les données de ChIP-seq Rpb1 dans les mutants *ck2^{ts}* montrent que les gènes les plus fortement transcrits présentent une diminution globale du niveau de polymérase alors que les régions géniques faiblement ou moyennement transcrites font quant à elles l'objet d'une occupation plus importante d'ARNPII sur toute leur longueur (Fig. 3.S2). Pourtant, si la distribution des complexes transcriptionnels est globalement modifiée en absence de CK2, la transcription sens des ARNm n'est que très faiblement affectée (chapitre2). Par RTqPCR aux loci *ACT1* et *PMA1* nous montrons en effet que malgré un niveau d'ARNPII près de deux fois supérieur dans les mutants *ck2^{ts}*, la quantité d'ARNm produite, et donc l'efficacité de la transcription, n'est pas modifiée. Une marque qui témoigne de l'activité transcriptionnelle est la phosphorylation de la sérine 2 du CTD, qui est amplement impliquée dans la transition vers la phase d'élongation processive. Curieusement, le ratio Rpb1-pSer2/Rpb1 aux régions codantes diminue en absence de CK2. De même, le signal Rpb1-pSer2 total est affecté (Fig. 3.11). Il est notamment montré que le profil de phosphorylation du CTD varie selon que l'ARNPII transcrit un ARNm ou bien un CUT (Milligan et al., 2016). La modulation de l'état de phosphorylation du CTD en absence de CK2 peut donc refléter soit que l'ARNPII recrutée en excès à la chromatine est inactive et ne produit pas de transcrit, soit qu'elle est dans un état d'activation différent de l'état canonique et associé à la production de bruit de fond transcriptionnel.

D'autre part, il existe une forte interdépendance fonctionnelle entre Spt6, Ctk1 et PAF dans le processus de phosphorylation des sérines 2 du CTD (Dronamraju and Strahl, 2014). Cela nous a donc conduits à nous questionner sur une éventuelle influence de la régulation de la stabilité de Spt6 par CK2 sur la phosphorylation des sérines 2 du CTD. Le mutant *spt6 7S-A* ne présente aucun défaut de pSer2 et le mutant phosphomimétique de Spt6 ne restaure pas la diminution de pSer2 totale dans un mutant *ck2^{ts}* (Fig. 3.12) montrant ainsi que le profil de phosphorylation du CTD dans *ck2^{ts}* est indépendant de la régulation de Spt6. Pour terminer, des relations fonctionnelles mal définies entre PAF et CK2 impliquent la kinase dans la régulation du dépôt d'H2B monoubiquitiné (Bedard et al., 2016). Ainsi, d'autres voies d'organisation de la chromatine lors de l'élongation pourraient faire intervenir une régulation CK2-dépendante. Nos analyses montrent que la diminution de la phosphosérine

2 des mutants *ck2^{ts}* est restaurée quand la fonction de PAF est altérée (*Δcdc73* et *Δpaf1*). En contrepartie, la perte d'H3K36me3 de *Δpaf1* est partiellement restaurée dans le double mutant *ck2^{ts}/Δpaf1* (Fig. 3.13). Ces données confirment un lien fonctionnel fort entre PAF et CK2 dans la régulation de différents marqueurs de l'organisation de la chromatine lors de l'élongation transcriptionnelle. Il est important de noter que nous n'observons pas d'effet direct de la perte de fonction de CK2 sur la triméthylation d'H3K36 suggérant une régulation complexe et indirecte de la kinase par le biais d'un ou plusieurs intermédiaires. L'interaction *in vivo* de CK2 avec des facteurs fondamentaux dans l'organisation de la chromatine comme Spt5, Chd1 ou Spt16 (Fig. 3.S4) constitue des perspectives d'analyses importantes dans ce contexte.

Dans l'ensemble, nous avons mis en évidence que CK2 phosphoryle Iws1 sans influencer ses fonctions dans la préservation co-transcriptionnelle de l'organisation de la chromatine. La kinase semble néanmoins stimuler la stabilité du complexe Spt6-Iws1 exclusivement via la phosphorylation de Spt6. Nous avons en outre décrit une élévation de l'occupation des complexes transcriptionnels sur la chromatine qui pourrait refléter l'accumulation considérable du bruit de fond transcriptionnel en absence de CK2. Enfin, nous avons montré que la déplétion de CK2 affecte l'état de phosphorylation du CTD indépendamment de la régulation de Spt6. Nos investigations nous ont à ce titre permis de mettre en lumière les interactions fonctionnelles complexes entre CK2 et PAF qui semblent intervenir dans la conservation du paysage épigénétique des régions transcrites. En conclusion, CK2 est un facteur essentiel de régulation de la structure de la chromatine et de la transcription via un réseau de signalisation complexe qui implique la probable modulation fonctionnelle de plusieurs facteurs d'élongation.

3.7. Figures supplémentaires

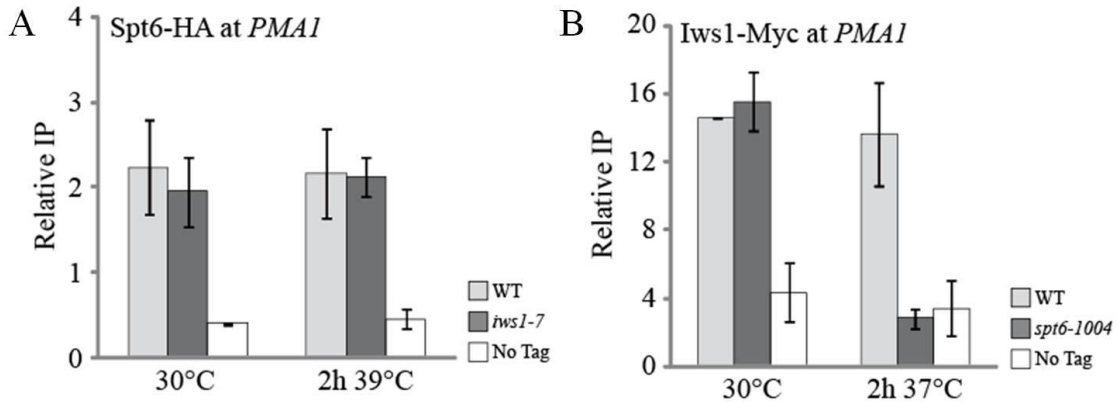


Figure 3.S1 : Le recrutement d'Iws1 à PMA1 dépend de Spt6 mais pas l'inverse

A- ChIP Spt6-HA sur des chromatines issues de souches WT et *iws1-7* exprimant Spt6-HA récoltées à 30°C et après 2h à 39°C. Une souche WT non étiquetée est utilisée comme contrôle. L'analyse en qPCR est réalisée au gène *PMA1* et normalisée par rapport à l'enrichissement en Spt6-HA à la région contrôle intergénique *NoORF*. **B-** ChIP Iws1-Myc sur des chromatines issues de souches WT et *spt6-1004* exprimant Iws1-Myc récoltées à 30°C et après 2h à 37°C. Une souche WT non étiquetée est utilisée comme contrôle. L'analyse en qPCR est réalisée au gène *PMA1* et normalisée par rapport à l'enrichissement en Iws1-Myc à la région contrôle intergénique *NoORF*.

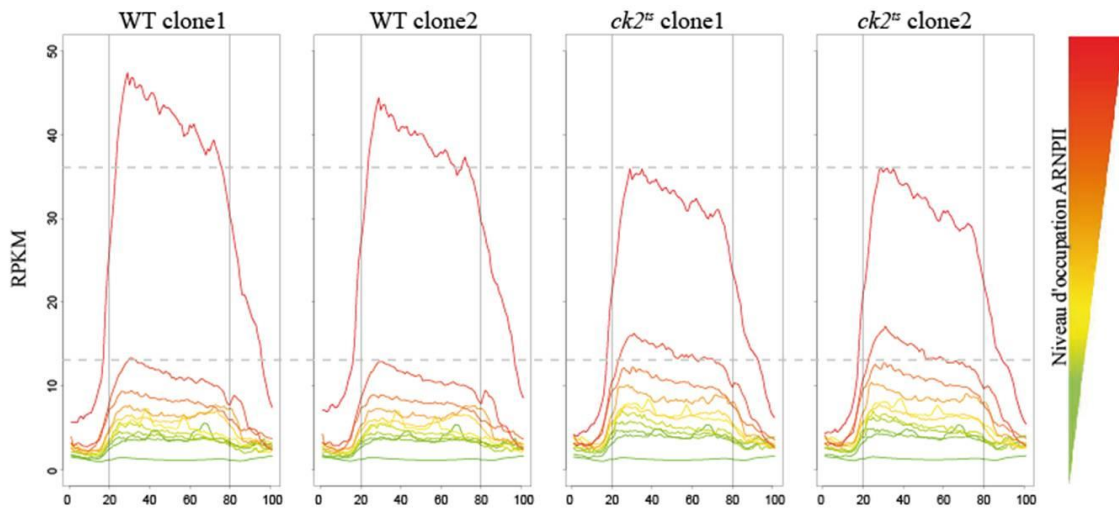


Figure 3.S2 : Niveau d'occupation d'ARNPII pour 10 groupes de gènes

Représentation moyenne du niveau d'occupation de l'ARNPII aligné au TSS pour 2 clones WT et 2 clones *ck2^Δ*. 10 groupes de gènes ont été générés en fonction du niveau d'occupation de l'ARNPII sur les régions codantes dans le WT, ce qui traduit une classification des gènes non transcrits (Vert) aux gènes les plus transcrits (Rouge).

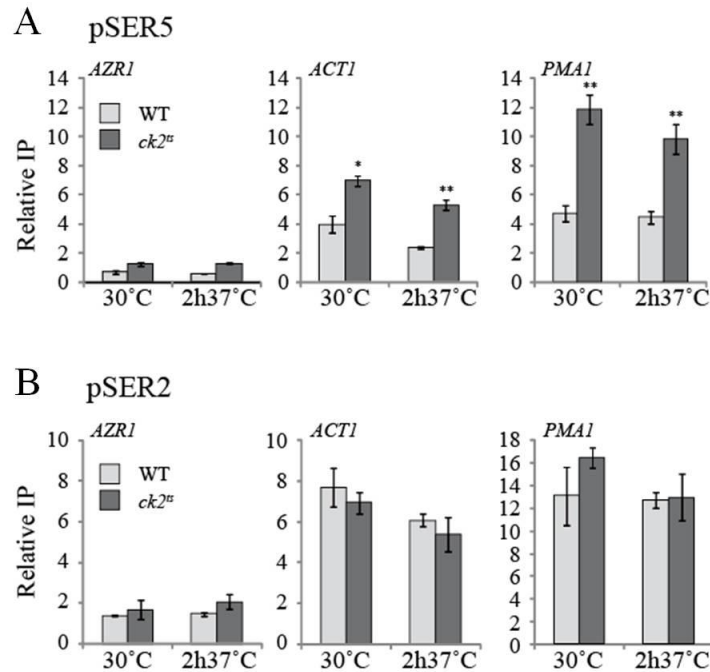


Figure 3.S3 : Évaluation du niveau d'ARNPII phosphorylée sur les sérines 5 et 2 du CTD dans les cellules WT et *ck2^{ts}*

A- ChIP Rpb1-pSer5 sur des chromatines issues de souches WT et *ck2^{ts}* récoltées à 30°C et après 2h à 37°C. L'analyse en qPCR est réalisée aux gènes transcrits *ACT1* et *PMA1*, au gène non transcrit *AZR1* puis normalisée par rapport à la région contrôle intergénique *NoORF*. **B-** ChIP Rpb1-pSer2 sur des chromatines issues de souches WT et *ck2^{ts}* récoltées à 30°C et après 2h à 37°C. L'analyse en qPCR est réalisée aux gènes transcrits *ACT1* et *PMA1*, au gène non transcrit *AZR1* puis normalisée par rapport à la région contrôle intergénique *NoORF*.

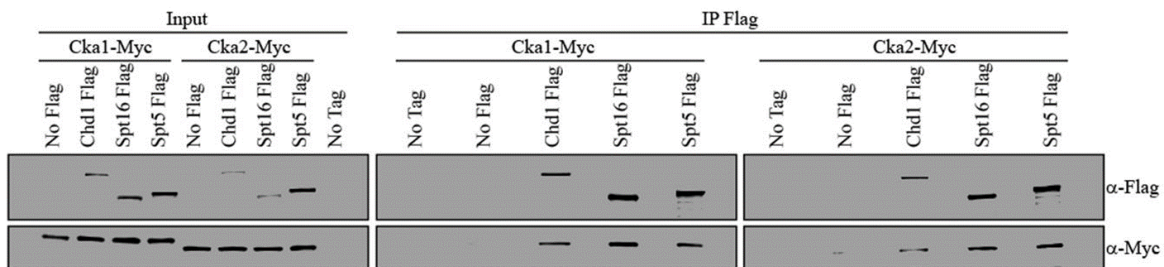


Figure 3.S4 : Les facteurs d'élongation Chd1-Flag, Spt16-Flag et Spt5-Flag interagissent avec les sous-unités catalytiques de CK2

Immunopurification dirigée contre l'épitope Flag dans les différentes souches indiquées. Les souches utilisées expriment respectivement Chd1-Flag, Spt16-Flag et Spt5-Flag et soit Cka1-Myc ou Cka2-Myc. Deux souches exprimant les allèles Myc mais non flaggées sont utilisées comme contrôles de purification. Les échantillons purifiés sont analysés par immunobuvardage avec des anticorps dirigés les épitopes Flag et Myc.

Chapitre IV: Discussion et conclusion

Les mécanismes de modulation de la structure de la chromatine associés à la transcription sont finement régulés. Ils permettent la progression de l'ARN polymérase II et assurent la restauration de l'organisation chromatinienne dans son sillage. Ces modes de régulation sont essentiels au maintien de l'état épigénétique des régions transcrites, et interviennent directement dans le contrôle de la dynamique et du positionnement des nucléosomes. Ils ont ainsi un impact majeur sur la régulation du programme d'expression des gènes, et leurs défaillances conduisent à la multiplication d'erreurs de la machinerie transcriptionnelle et à l'accumulation de transcrits opportunistes.

La Caséine Kinase 2 (CK2) est une protéine kinase conservée dans le domaine eucaryote et impliquée dans une multitude de processus cellulaires. Plusieurs indications convergent vers un rôle potentiel de la kinase dans la régulation du programme transcriptionnel (Barz, 2003; Basnet et al., 2014), notamment via la régulation de facteurs chromatinien impliqués dans la dynamique des nucléosomes, tels que les chaperons d'histones (Bhat et al., 2013; Bouazoune and Brehm, 2005; Calvert et al., 2008; Li et al., 2005).

Au cours de mon doctorat, j'ai mis en évidence que CK2 est essentiel au maintien de la fidélité du programme transcriptionnel. En effet, l'ARNPII est d'une nature promiscuitaire qui conduit à la production de transcrits aberrants. Pour prévenir ce phénomène, le processus transcriptionnel survient dans un environnement chromatinien finement contrôlé qui oriente et optimise la fonction de l'ARNPII afin d'en limiter les erreurs. Mes travaux montrent pour la première fois que CK2 intervient directement dans ces mécanismes en modulant la dynamique des nucléosomes sur les régions codantes, via notamment la régulation de la stabilité du chaperon d'histones Spt6. Notre étude se concentre principalement sur la caractérisation de cette voie de régulation et de son importance à l'échelle cellulaire. Nous démontrons que la régulation de Spt6 par CK2 est capitale dans le contrôle de la dynamique de l'histone H3 et restreint la production de transcrits opportunistes sur l'ensemble du génome. Si l'inactivation de cette voie de régulation a des conséquences modestes sur l'expression des gènes en conditions métaboliques de base elle retentit toutefois négativement sur l'efficacité de la réponse transcriptionnelle à un stimulus extérieur. Ainsi, CK2 promeut la précision de l'ARNPII ce qui paraît favoriser l'adaptation transcriptionnelle des cellules vis-à-vis de leur environnement.

4.1. CK2 module la fonction de Spt6 pour favoriser la conservation co-transcriptionnelle des histones

Nous avons tout d'abord mis en évidence que la perte de fonction de CK2 entraîne une hausse du niveau d'H3K56 acétylée indépendante de la réplication dans les régions transcrites (Fig. 2.1A). Cela suggère un rôle de la kinase dans la modulation de l'équilibre entre l'échange et le recyclage des histones des régions codantes lors de la transcription. L'analyse directe par ChIP-seq de l'incorporation de l'histone Flag-H3 nouvellement synthétisée montre que CK2 limite l'échange en 3' des gènes sur l'ensemble du génome (Fig. 2.1E). L'augmentation de l'incorporation de nouvelles histones en 3' traduit clairement une défaillance cellulaire dans la restructuration de la chromatine suite à l'élongation transcriptionnelle. Nous avons donc supposé que l'absence de CK2 affecte un mécanisme impliqué dans le maintien ou le recyclage des histones mobilisées lors du passage de l'ARNPII, ce qui serait compensé par l'incorporation d'histones nouvellement synthétisées et expliquerait de fait l'augmentation du niveau d'H3K56 acétylée dans les régions transcrites.

A ce titre, le chaperon d'histones Spt6 joue un rôle capital dans la réorganisation de la chromatine lors de la transcription (Kaplan et al., 2003). Il est proposé qu'il favorise le maintien des histones H3 déjà présentes afin de conserver le statut épigénétique des régions transcrites (Kato et al., 2013). Notre étude met en évidence que la phosphorylation de Spt6 par CK2 régule ces fonctions. Nous proposons le mécanisme selon lequel CK2 phosphoryle Spt6 afin de favoriser le recyclage des histones présentes dans la chromatine lors de la transcription. En absence de cette voie de régulation, les défauts de recyclage pourraient être compensés par l'incorporation de nouvelles histones, engendrant une modification du statut épigénétique des régions transcrites (Fig. 4.1). Nos données indiquent en effet que le mutant *spt6 7S-A* non phosphorylable présente une augmentation du niveau d'H3K56ac aux régions transcrites testées (Fig. 2.4D), et par opposition, l'expression du mutant phosphomimétique *spt6 7S-D* dans des cellules *ck2^{ts}* supprime ce phénotype (Fig. 2.5C). Ainsi, la voie de régulation faisant intervenir CK2 et Spt6 joue un rôle général dans la conservation co-transcriptionnelle des tétramères H3-H4 au cours de l'élongation. La défaillance de cette voie aura pour conséquence une modification de la

nature des nucléosomes qui se traduit notamment par une élévation de l'acétylation des régions transcrites. Ainsi, l'absence de la voie de régulation CK2-Spt6 modifie le paysage épigénétique des régions géniques, qui constitue un mode de signalisation déterminant pour de nombreux mécanismes de régulation chromatinien et transcriptionnel.

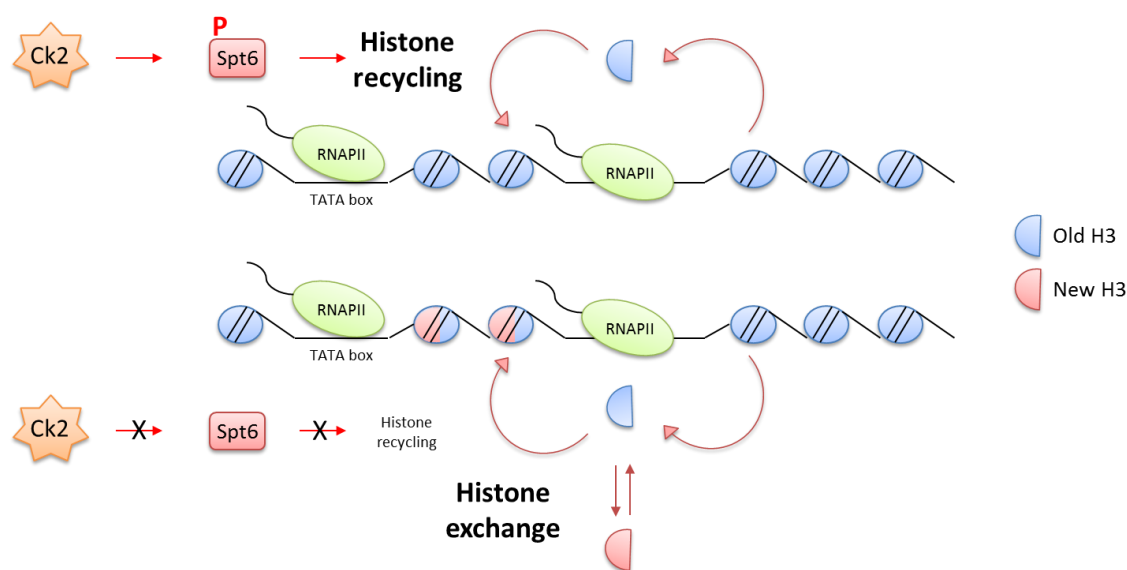


Figure 4.1 : CK2 phosphoryle Spt6 pour favoriser le recyclage au détriment de l'échange d'histones lors de l'élongation transcriptionnelle.

Le chaperon d'histones Spt6 est également impliqué dans le positionnement précis des nucléosomes sur l'ADN (DeGennaro et al., 2013; van Bakel et al., 2013). On peut donc supposer que l'altération de ses fonctions en absence de CK2 ait un impact sur l'organisation spatiale des nucléosomes sur les gènes. L'organisation des nucléosomes sur la chromatine est hautement contrôlée, et dépend d'une part de la séquence d'ADN, mais également de l'action coordonnée des régulateurs de la chromatine comme les facteurs de remodelage ou les chaperons d'histones. Des analyses de type MNase-Seq non présentées ici, et menées au laboratoire, ont montré que la mutation d'Iws1 (*iws1-7*), principal partenaire de Spt6, conduit à un changement global du positionnement des nucléosomes. On peut émettre l'hypothèse que la régulation de la fonction de Spt6 par CK2 module également ce phénomène. En perspective, il sera important de déterminer de la même

façon, en quelle proportion l'absence de phosphorylation de Spt6 par CK2 influence le positionnement nucléosomal sur l'ADN.

Par ailleurs, il sera intéressant de comparer les profils d'occupation nucléosomale des mutants *ck2^{ts}* et *spt6 7S-A*. En effet, il est clairement démontré que le maintien d'un profil nucléosomal précis est la résultante de l'action concertée de nombreux facteurs chromatiniens (van Bakel et al., 2013). En plus de la phosphorylation de Spt6, CK2 phosphoryle de façon potentielle ou avérée plusieurs de ces facteurs (Basnet et al., 2014; Bhat et al., 2013; Krogan et al., 2002; Li et al., 2005). Ainsi, la kinase pourrait participer à la coordination fonctionnelle entre Spt6 et d'autres régulateurs chromatiniens impliqués dans le positionnement des nucléosomes, maintenant un équilibre essentiel à l'organisation précise de la chromatine.

4.2. CK2 joue un rôle général dans la préservation de la fidélité transcriptionnelle

Le rôle de CK2 dans la régulation transcriptionnelle a précédemment été évoqué dans la littérature, majoritairement en tant que régulateur de l'expression génique lié à des voies de signalisation cellulaire et à la régulation de facteurs de transcription spécifiques (Barz, 2003). Si les liens entre CK2 et des facteurs chromatiniens ont également été abordés (Bhat et al., 2013; Calvert et al., 2008; Krogan et al., 2002; Li et al., 2005), c'est la première fois qu'une étude à grande échelle montre que CK2 limite de façon globale la transcription opportuniste en régulant la fonction d'un facteur d'organisation des nucléosomes : le chaperon d'histones Spt6. En effet, nous avons démontré que la déplétion de CK2 modifie la composante épigénétique des régions transcrites et pourrait potentiellement influencer le positionnement des nucléosomes, via le défaut de phosphorylation de Spt6. La conservation des marques épigénétiques et l'organisation spatiale des nucléosomes sur l'ADN participent activement à la régulation du transcriptome et orientent la machinerie transcriptionnelle pour limiter ses erreurs et l'accumulation de transcrits aberrants.

Notre analyse brin spécifique du transcriptome montre que CK2 et la phosphorylation de Spt6 sont nécessaires pour limiter l'accumulation globale de transcrits opportunistes

antisens et sens (Fig. 2.2 et 2.5). En revanche, la production des ARNm n'est pas fondamentalement altérée dans les mutants *ck2^{ts}* et *spt6 7S-A*, à l'exception de la transcription de certains gènes extrêmes, très fortement ou très faiblement transcrits (Fig. 2.2 et 2.5). La forte analogie entre les transcrits antisens accumulés dans les mutants *ck2^{ts}* et *spt6 7S-A* renforce le fait que CK2 et Spt6 interviennent bien dans la même voie de régulation chromatinienne. De façon intéressante, la mutation de certains facteurs chromatiens (Spt21, Spt10, CAF1, CHD1) engendre une modification de l'espacement des nucléosomes sur les régions transcrites associée à une élévation de la transcription antisens (Pointner et al., 2012; van Bakel et al., 2013). Le rôle avéré de Spt6 (DeGennaro et al., 2013) et de son partenaire Iws1 dans le positionnement des nucléosomes sur les gènes, et le lien entre l'espacement des nucléosomes et la transcription cryptique antisens, soulignent à nouveau l'importance d'investiguer l'impact de la voie de régulation CK2-Spt6 sur la localisation précise des nucléosomes sur l'ADN.

Le préjudice causé par des défauts de reconstitution des nucléosomes au cours de l'élongation transcriptionnelle, vis-à-vis de la précision de l'ARNPII, a été largement étudié par le laboratoire du Dr Fred Winston, qui place notamment Spt6 au centre de ce mécanisme. En effet, un trait caractéristique des défauts de reconstitution chromatinienne liés à la défaillance du facteur Spt6, est l'apparition globale de transcrits opportunistes intragéniques issues des promoteurs cryptiques (Cheung et al., 2008; Kaplan et al., 2003). Notre étude montre que CK2 module la fonction de Spt6 pour influencer la composante nucléosomale des régions codantes, limitant ainsi l'apparition de transcrits issus des promoteurs cryptiques intragéniques sur l'ensemble du génome.

Nous avons mis cela en évidence par l'analyse des données de RNA-seq à travers l'enrichissement 3' des ARN, qui traduit une initiation intragénique potentielle à de nombreux gènes dans les mutants *ck2^{ts}* et *spt6 7S-A*. Ceci est confirmé par Northern Blot pour des gènes possédant des promoteurs cryptiques connus et préalablement identifiés par le laboratoire du Dr Winston (Cheung et al., 2008 ; Fig. 2.2 et 2.5) tels que *DDC1*, *FLO8* ou encore *SPB4*. De façon intéressante, le promoteur cryptique de *SPB4* est activé dans les mutants *ck2^{ts}* mais pas dans les mutants *spt6 7S-A* (Fig. 2.2I et 2.5G). De plus, si les listes des gènes qui présentent une hausse de l'enrichissement 3' dans les mutants *ck2^{ts}* et *spt6*

7S-A sont fortement similaires, elles ne se recoupent pas parfaitement. Il est montré que les mutations de différents facteurs chromatinien impliqués dans l'élongation transcriptionnelle (Spt6, Spt16, Spt5, CHD1, SET2...) conduisent à l'apparition de transcrits cryptiques à des gènes parfois différents et avec un phénotype d'une intensité variable (Cheung et al., 2008; Smolle et al., 2012). Si une forme de redondance fonctionnelle est communément admise entre certains de ces facteurs d'élongation, la combinaison de leur fonction est cependant nécessaire à la suppression de la transcription cryptique intragénique. Ainsi CK2 pourrait moduler l'organisation de la chromatine via la régulation d'autres facteurs impliqués dans l'élongation. De la même façon, l'enrichissement antisens est étendu à plus de gènes dans les mutants *ck2^{ts}* que dans les mutants *spt6 7S-A* (Fig. 2.5I). Le rôle avéré ou potentiel de CK2 dans la régulation de plusieurs facteurs chromatinien est un argument qui renforce l'hypothèse que CK2 pourrait préserver la structure de la chromatine et supprimer la transcription opportuniste, en régulant de multiples voies complémentaires.

De façon générale, la transcription cryptique est limitée par la structure de la chromatine qui joue un rôle préventif, et par l'exosome qui joue un rôle palliatif en dégradant rapidement les ARN transcrits par erreurs de l'ARNPII. L'importance de Spt6 dans la suppression de la transcription cryptique via l'organisation de la chromatine des régions transcrites est clairement démontrée (Cheung et al., 2008; DeGennaro et al., 2013; Ivanovska et al., 2011; Uwimana et al., 2017). Mais de façon intéressante, un lien fonctionnel entre Spt6 et la machinerie exosomale a également été proposé chez la drosophile (Andrulis et al., 2002). Ainsi, Spt6 pourrait se situer à la croisée des chemins de ces deux voies cruciales pour le maintien de l'homéostasie transcriptionnelle. L'ensemble de nos données nous a toutefois convaincu que CK2 supprime la transcription opportuniste en influençant directement la capacité de Spt6 à reconstituer et à organiser les nucléosomes et le paysage épigénétique des régions codantes.

4.3. CK2 régule-t-elle les interactions de Spt6 avec ses différents partenaires ?

Spt6 interagit avec plusieurs partenaires protéiques qui influencent ses fonctions. L'interaction entre Spt6 et Iws1, conservée chez les eucaryotes supérieurs et essentielle chez la levure, est d'une grande importance dans la régulation fonctionnelle de Spt6. En effet, les interactions Spt6-Iws1 et Spt6-nucléosome engagent le même domaine protéique situé en N terminal : Spt6²³⁹⁻²⁶⁸. Elles semblent mutuellement exclusives et sont compétitives entre elles (McDonald et al., 2010). Le complexe Spt6-Iws1 est donc particulièrement impliqué dans l'organisation de la structure de la chromatine et il est proposé que sa formation altère l'interaction Spt6-nucléosome et favorise ainsi le relargage des nucléosomes sur l'ADN lors de leur réassemblage après l'élongation transcriptionnelle (McCullough et al., 2015; McDonald et al., 2010).

Nos analyses démontrent que CK2 phosphoryle les deux membres du complexe, mais seule la phosphorylation de Spt6 est nécessaire au maintien de l'organisation de la chromatine et à la suppression de la transcription cryptique. De plus, CK2 phosphoryle Spt6 en N-terminal, à proximité du domaine d'interaction avec Iws1, et la phosphorylation de Spt6 par CK2 stimule la formation du complexe *in vitro* (Annexe 1-B, C). Nous avons initialement émis l'hypothèse que CK2 pourrait favoriser la formation du complexe Spt6-Iws1 en phosphorylant Spt6, et ainsi moduler sa fonction lors de l'élongation. Il est intéressant de souligner que les travaux précédemment publiés par le laboratoire démontrent que CK2 régule l'interaction de Spt6 avec la protéine Spt2 (Bhat et al., 2013). Spt2 est un chaperon d'histone principalement associé aux régions transcrites, qui possède deux domaines HMG-like qui permettent une liaison à l'ADN (Chen et al., 2015; Nourani et al., 2006). Fonctionnellement, le laboratoire a précédemment proposé que la protéine Spt2, via son domaine HMG, pourrait faciliter la liaison de Spt6 avec les nucléosomes pour favoriser leur reconstitution pendant la transcription (Bhat et al., 2013).

Un modèle séduisant serait que la phosphorylation par CK2 favorise l'interaction Spt6-Iws1 au détriment de l'interaction Spt6-Spt2 et Spt6-nucléosome, pour organiser la fonction de Spt6 lors de la reconstitution de la chromatine lors de la transcription (Fig. 4.2). Ainsi la phosphorylation CK2-dépendante influencerait la fonction de Spt6 en orchestrant ses

interactions successives avec ses partenaires au cours de l'élongation. *In vitro*, nos analyses démontrent que la phosphorylation de Spt6 par CK2 stabilise l'interaction avec Iws1, et serait donc défavorable à une interaction avec les nucléosomes. Toutefois, les analyses *in vivo* de la formation du complexe ne sont pour l'instant pas concluantes dans nos conditions expérimentales. En effet, la modulation de la stabilité de Spt6 ainsi que la nature essentielle à la survie cellulaire du complexe Spt6-Iws1 compliquent notre étude. Une alternative serait d'une part d'examiner *in vitro* l'influence de CK2 sur la compétition des interactions entre Spt6, Iws1 et les nucléosomes. D'autre part, il serait également intéressant de tester directement dans ce contexte les mutants de phosphorylation de Spt6 (*spt6 7S-A* ; *spt6 7S-D*) afin de corroborer ou non notre modèle.

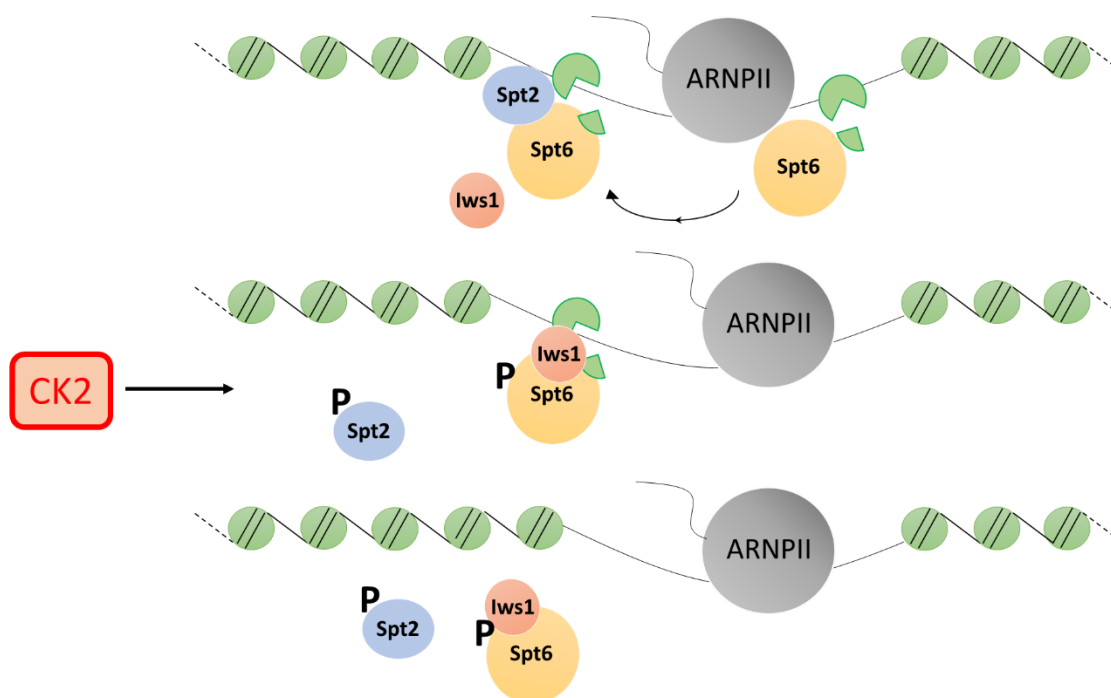


Figure 4.2 : Modèle de travail selon lequel CK2 favorise l'échange entre les facteurs Spt2 et Iws1 successivement en complexe avec Spt6 pour réguler sa fonction.

Alternativement, il est également montré que Spt6 participe au recrutement de la méthyltransférase Set2 lors de l'élongation (Yoh et al., 2008, 2007). Spt6 favorise ainsi le dépôt co-transcriptionnel d'H3K36me3 qui est une marque épigénétique cruciale à la suppression de la transcription cryptique intragénique (B. Li et al., 2007b; Venkatesh et al., 2012; Youdell et al., 2008). De plus, le complexe Spt6-Iws1 à proprement parler est

impliqué chez les mammifères dans le recrutement de Set2. En effet, il est montré que Iws1 constitue un lien physique entre Spt6 et Set2, nécessaire à une triméthylation efficace d'H3K36 (Yoh et al., 2008). Nous avons donc émis l'hypothèse que CK2 contribue au maintien de l'organisation chromatinienne en modulant la stabilité du complexe Spt6-Iws1, influençant ainsi le recrutement de Set2 aux régions transcrites.

En effet, aux vues de nos résultats *in vitro*, la phosphorylation de Spt6 par CK2 stabilise son interaction avec Iws1. Dans nos conditions expérimentales, l'analyse directe de l'interaction Spt6-Iws1 *in vivo* n'est toutefois pas convaincante. Cependant, si comme chez la souris, le recrutement de Set2 aux régions transcrites de levure dépend fortement du complexe Spt6-Iws1, alors même une légère déstabilisation du complexe en absence de CK2 pourrait altérer la triméthylation d'H3K36. Or, nos investigations indiquent que CK2 n'influence pas le niveau cellulaire d'H3K36me3, ni son niveau à la chromatine dans les régions transcrites testées (Fig 3.8). L'activation de promoteurs cryptiques intragéniques, en absence de régulation de Spt6 par CK2, n'est donc pas issue d'une défaillance de la voie Set2-H3K36me3, mais liée à une voie alternative de régulation chromatinienne dépendante de CK2 et Spt6.

4.4. CK2 régule le niveau cellulaire de Spt6 pour moduler sa fonction.

La caractérisation des mutants de phosphorylation de Spt6 nous a permis de montrer une diminution globale du niveau protéique de Spt6 7S-A, traduisant une altération de sa stabilité. Cependant, nous n'avons pas observé de variations claires de l'intégrité du complexe Spt6-Iws1 *in vivo* en absence de CK2. Ceci porte à croire que seule la fraction non-complexée de Spt6 est affectée en l'absence de phosphorylation par CK2.

L'étude à grande échelle des profils de distribution sur la chromatine de Spt6 et Iws1 montre des différences entre les deux partenaires qui supportent le fait que Spt6 possède des fonctions indépendante d'Iws1, et n'agit pas uniquement sous forme de complexe (Mayer et al., 2010). Il est montré dans la littérature que le niveau protéique de Spt6 est également crucial pour sa fonction, et nos observations nous permettent de penser que CK2 régule la stabilité de la fraction libre de Spt6, modulant ainsi ses fonctions indépendantes de

Iws1. En accord avec les observations du laboratoire de Fred Winston (Clark-Adams and Winston, 1987), nous observons que dans une cellule diploïde, la délétion d'une des deux copies du gène *SPT6* entraîne l'apparition d'un phénotype *spt-*, traduisant des défauts de structure de la chromatine (Fig. 2.6B). Une étude récente a déterminé que la bonne réalisation des fonctions de Spt6 repose en partie sur la concentration cellulaire élevée de la protéine. En effet, il est estimé qu'une cellule possède en moyenne une molécule de Spt6 pour trois nucléosomes, suggérant des contacts fréquents entre eux (McCullough et al., 2015). L'interaction entre les histones et leurs chaperons est bien évidemment régie par la structure des partenaires en présence, mais également par l'affinité de leur interaction, elle-même dépendante de leurs concentrations respectives.

De manière intéressante, nous démontrons *in vivo* que la stabilité des mutants de phosphorylation de Spt6 (*spt6 7S-A* et *spt6 7S-D*) est altérée. Le mutant non phosphorylable *spt6 7S-A* est plus instable, le mutant phosphomimétique *spt6 7S-D* est au contraire stabilisé et supprime le turnover d'H3 ainsi que la transcription cryptique dans les cellules *ck2^{ts}*. Ainsi, CK2 régule assurément la fonction de Spt6 par le biais de la modulation de son niveau protéique. Dans la littérature, un rôle comparable de CK2 a été démontré dans la régulation du niveau cellulaire du variant d'histone Cse4, via son adressage au protéasome (Hewawasam et al., 2014). La régulation de la stabilité de Spt6 par CK2 pourrait donc faire intervenir une voie de dégradation similaire. En perspective, il sera intéressant de réaliser des expériences qui combinent l'étude de la stabilité des phosphomutants *spt6 7S-A / 7S-D* à l'inhibition du protéasome (au MG132 par exemple) afin de déterminer plus précisément le mécanisme qui module le niveau cellulaire de Spt6.

Par ailleurs, il semble que le complexe Spt6-Iws1 ait un rôle protecteur vis-à-vis de Spt6. En effet, nos expériences de CHIP à certains loci ne montrent pas de variation des niveaux absolus de Spt6 ou Iws1 aux gènes constitutivement transcrits (Fig. 3.6). De même, les analyses de co-immunoprécipitation des deux partenaires indiquent que l'interaction Spt6-Iws1 *in vivo* est préservée, alors que la quantité totale de Spt6 diminue en absence de CK2. Cela suggère que seule la fraction libre de Spt6 pourrait être soumise à une régulation de sa stabilité par la phosphorylation dépendante de CK2, alors que la fraction complexée à Iws1 semble stable. Il paraît cependant surprenant que la quantité totale de Spt6 soit affectée sans aucun retentissement sur la formation du complexe en absence de CK2. On peut envisager

par exemple, que face à un déficit en Spt6, la réponse adaptative des cellules soit d'induire une forme plus stable de l'interaction Spt6-Iws1 afin de préserver les fonctions essentielles du complexe.

De façon générale, un déficit en Spt6 pourrait conduire à un défaut de recyclage, ou de disponibilité de la protéine à la chromatine, qui pourrait avoir des conséquences sur la capacité des cellules à s'adapter à un changement radical du programme transcriptionnel. Dès lors, il sera intéressant d'analyser sur l'ensemble du génome l'occupation de Spt6 et Iws1 dans les mutants *ck2^{ts}* et *spt6 7S-A*. On peut en effet supposer qu'un déficit en Spt6 soit à l'origine d'une relocalisation globale de la protéine, aux gènes constitutifs par exemple, pour maintenir au mieux l'homéostasie chromatinienne et transcriptionnelle.

4.5. L'absence de CK2 altère la distribution et l'activité de l'ARNPII

Nos résultats indiquent une élévation générale de la dynamique des nucléosomes des régions transcrites qui s'accompagne d'une hausse importante du bruit de fond transcriptionnel en absence de CK2. L'analyse de la localisation de l'ARNPII sur l'ensemble des gènes traduit une augmentation globale de son association à la chromatine, à l'exception des gènes très fortement transcrits.

Ce phénomène peut être justifié par deux raisons interdépendantes : L'absence de CK2 provoque d'une part une désorganisation de la chromatine qui a elle seule entraîne un positionnement hasardeux de l'ARNPII. D'autre part, cette observation inattendue, du fait de la relative constance de la production des ARNm en absence de CK2, est toutefois cohérente avec une augmentation du bruit de fond transcriptionnel. On peut en effet envisager que le bruit de fond transcriptionnel accumulé dans ces mutants est imputable aux ARNPII surnuméraires détectées.

Premièrement, l'augmentation du niveau d'ARNPII, couplée à la hausse de la dynamique des nucléosomes dans les régions transcrites, soulève la question du lien entre la transcription et l'échange d'histones. Est-ce que l'ARNPII recrutée plus massivement mobilise plus les histones lors de la transcription, ce qui expliquerait une dynamique nucléosomale plus élevée dans les mutants *ck2^{ts}*? Ou est-ce la hausse de l'échange, au

détriment du recyclage des histones, qui est un phénomène purement chromatinien en absence de CK2? Dans ce dernier cas, seule la désorganisation de la chromatine pourrait faciliter le positionnement hasardeux de l'ARNPII à la chromatine, alors plus susceptible aux évènements d'initiation transcriptionnelle aberrants.

Nos données apportent des éléments de réponses partiels à ces questions complexes. On observe que contrairement au mutant *ck2^{ts}*, le mutant *spt6 7S-A* ne présente pas d'élévation du niveau d'ARNPII aux régions transcrites testées (Fig. 3.10-12). Néanmoins, les mutations non phosphorylables de Spt6 conduisent à une élévation du bruit de fond transcriptionnel, associée à une hausse de la dynamique des nucléosomes comparable à celle des mutants *ck2^{ts}*. Au regard de ces observations, on peut supposer que l'élévation de l'échange est la conséquence d'une dérégulation d'un mécanisme chromatinien plutôt que l'effet de la transcription à proprement parler. Ainsi, l'élévation de la dynamique des nucléosomes régulés par la voie CK2-Spt6 donne lieu à une accumulation de transcrits opportunistes due à une défaillance de régulation chromatinienne en absence de CK2.

Néanmoins, l'augmentation du niveau d'ARNPII des mutants *ck2^{ts}*, que nous n'observons pas dans les mutants *spt6 7S-A*, pourrait refléter une transcription opportuniste due à la déplétion de CK2 mais indépendante de la régulation de Spt6. Dans ce contexte, l'évaluation de l'état de phosphorylation du CTD de l'ARNPII atteste que le niveau global de sérines 2 phosphorylées est affecté en absence de CK2 (Fig. 3.11). Ceci témoigne d'une défaillance de la signalisation liée à la phase d'élongation processive dans ces mutants. Il apparaît donc que la polymérase excédentaire, présente aux gènes transcrits des mutants *ck2^{ts}*, n'est pas dans un état d'élongation canonique, ce qui justifie que la transcription des ARNm ne soit pas drastiquement affectée. En outre, il est montré dans la littérature que le profil de phosphorylation du CTD varie selon que l'ARNPII transcrit un ARNm, ou un ARN non codant tel un CUT (Milligan et al., 2016). La modulation de l'état de phosphorylation du CTD en absence de CK2 peut donc signifier soit que l'ARNPII présente en excès à la chromatine est inactive et ne produit pas de transcrit, soit qu'elle est dans un état d'activation différent de l'état canonique qui pourrait être associé à la production de bruit de fond transcriptionnel.

La phosphorylation des sérines 2 du CTD est un processus complexe, régulé par de multiples acteurs. A ce titre, un lien d'interdépendance fonctionnelle intéressant a été mis

en évidence dans la littérature entre Spt6 et Ctk1, principale kinase impliquée dans la phosphorylation des sérines 2. En effet, le recrutement en 5' des gènes, et la fonction de Spt6 et Ctk1, semblent mutuellement dépendants et reposent notamment sur complexe PAF pour assurer la phosphorylation des sérines 2 lors de la transcription (Burugula et al., 2014; Dronamraju and Strahl, 2014).

Nous avons dans un premier temps évalué si la régulation de Spt6 par CK2 affecte sa fonction dans le processus de phosphorylation des sérines 2 du CTD. Nos résultats indiquent que le niveau de Rpb1-pSer2 est stationnaire dans les mutants *spt6 7S-A*, et que *spt6 7S-D* ne restaure pas le déficit global observé en absence de CK2 (Fig. 3.12). La voie de régulation de Spt6 par CK2 s'avère donc sans influence directe apparente sur la phosphorylation du CTD. Plusieurs pistes à explorer sont envisageables dans ce contexte. En effet, il est démontré que CK2 phosphoryle Bdf1 (Sawa et al., 2004), Fcp1 (phosphatase du CTD) (Palancade et al., 2002), ou encore le complexe PAF (Bedard et al., 2016). L'ensemble de ces facteurs ont une influence sur l'élongation transcriptionnelle en général, et sur pSer2 plus spécifiquement.

Concernant le complexe PAF, ses relations fonctionnelles avec CK2 semblent complexes et constituent une voie d'étude intéressante à explorer quant au rôle additionnel de CK2 sur la suppression de la transcription cryptique, au-delà de la régulation de Spt6. Des analyses complémentaires seront donc nécessaires pour mieux comprendre les interactions entre les fonctions de PAF et de CK2 dans ce contexte.

4.6. Conséquences cellulaires de l'élévation de la transcription cryptique

En absence de CK2, la distribution et la fonction d'une fraction des ARNPII semble détournée, causant notamment une importante accumulation de transcrits cryptiques. Ces répercussions globales soulèvent la question de l'impact de la production massive de transcrits aberrants sur le programme transcriptionnel initial des cellules. L'analyse à grande échelle des ARNm dans les mutants *ck2^{ts}* et *spt6 7S-A* ne dévoile pas une altération critique de la transcription canonique. Pourtant, l'ensemble de nos résultats indique à la fois une modification de la dynamique des histones qui s'accompagne d'un changement

épigénétique des régions codantes, et une altération du profil d'occupation de la machinerie transcriptionnelle et de la phosphorylation du CTD associée à l'élongation transcriptionnelle. Nous nous attendions donc à ce que la déplétion de CK2 soit plus préjudiciable sur l'expression du génome. A l'exception de certains gènes, dont la plupart sont soit très fortement transcrits, soit très faiblement exprimés, la majorité de la production des ARNm ne varie pas.

La question des interconnexions entre la transcription des gènes et la transcription opportuniste reste aujourd'hui posée. Notre étude ne montre pas de corrélation générale entre le niveau d'expression des gènes dans les cellules WT et l'élévation de la transcription cryptique (antisens et intragénique) dans les mutants. Cependant certains exemples montrent clairement une interdépendance entre les deux formes transcriptionnelles. En accord avec la littérature (Camblong et al., 2009, 2007) nous constatons par exemple que la transcription antisens au locus *PHO84* s'accompagne d'une répression de la transcription de son ARNm (Fig. 2.2 et 2.5). Dans ce cas précis, il a été démontré que l'accumulation de l'ARN antisens est directement responsable de la répression de la transcription sens (Camblong et al., 2009, 2007). On peut également imaginer que des machineries transcriptionnelles évoluant dans des directions opposées sur un même locus aient un impact sur leurs efficacités respectives, tant par l'encombrement stérique généré que par les modifications locales de la chromatine. Nous avons testé cette hypothèse en analysant la corrélation générale entre l'élévation de la transcription antisens et l'altération significative de la transcription sens sur un même locus dans des conditions métaboliques de base. Cependant, aucune relation claire et directe n'a émergé de cette analyse. En somme, l'étude du transcriptome dans ces conditions expérimentales (conditions de culture cellulaire classiques) ne permet pas de déceler une influence significative de l'élévation de la transcription opportuniste sur la transcription des gènes.

De façon générale, dans des conditions standards de culture cellulaire, la transcription des gènes n'est pas drastiquement affectée par la multiplication des erreurs commises par l'ARNPII en absence de CK2. Ce phénomène, consommateur d'énergie, correspond pourtant à un déséquilibre du système transcriptionnel, normalement très contrôlé. Dans ces conditions métaboliques classiques, on peut qualifier le programme transcriptionnel de régime de base à l'état d'équilibre. L'élévation de la transcription cryptique place de fait cet

état d'équilibre en « surrégime », pouvant être néfaste à long terme ou dans des conditions métaboliques plus rigoureuses. Nous avons donc émis l'hypothèse que la transcription cryptique affecte la réponse cellulaire dans des situations de stress métabolique. Une publication qui appuie notre hypothèse a notamment montré que la mutation de plusieurs facteurs chromatinien induit des répercussions sur la production des ARNm principalement dans des conditions de stress extérieur, quand les cellules doivent faire face et s'adapter à l'environnement (Weiner et al., 2012).

Nous nous sommes donc placés dans des situations qui nécessitent des réponses transcriptionnelles efficaces telles que des changements drastiques de voies métaboliques. Nous montrons que CK2 et la phosphorylation de Spt6 sont nécessaires à la réponse cellulaire, lors d'une modification de la source de carbone ou lors de la privation en histidine. En effet, le changement rapide de programme transcriptionnel qui en résulte ne s'opère pas de façon optimale tant sur le plan du recrutement de l'ARNPII aux gènes induits que sur la production d'ARNm. En absence de CK2, la production hasardeuse de transcrits cryptiques pourrait induire une forme de titration de la machinerie transcriptionnelle, qui serait alors moins prédisposée à une relocalisation rapide et à une réponse efficace aux signaux environnementaux. Il sera intéressant d'étudier cela en testant si la suppression de la transcription cryptique par l'expression du mutant phosphomimétique *spt6 7S-D* dans des cellules *ck2^{ts}* restaure, au moins en partie, l'efficacité de la réponse transcriptionnelle en situation de stress.

4.7. Conclusion

Le rôle de CK2 dans la régulation de la transcription et son implication dans la modulation chromatinienne ont régulièrement été évoqués dans la littérature. Cependant, son grand nombre de substrats fait de CK2 une cible d'étude complexe quand il s'agit de déterminer ce qui relève ou non d'une régulation directe par la kinase.

Notre étude met pour la première fois en évidence que CK2 régule la fidélité du programme transcriptionnel en favorisant le réassemblage et le maintien des nucléosomes sur l'ADN des régions transcrites suite à l'élongation. Nous montrons que CK2 régule directement la

fonction du chaperon d'histones Spt6 dans la dynamique des nucléosomes associée à la transcription. CK2 permettrait ainsi de préserver une organisation chromatinienne qui limite l'accumulation de transcrits cryptiques. S'il est connu que les mutations qui affectent la fonction de Spt6 sont à l'origine d'une accumulation de transcrits opportunistes associés à des défauts d'organisation de la chromatine, c'est la première fois que l'on met en évidence une modification post-traductionnelle du chaperon d'histones qui module sa fonction. Cette modulation dépend notamment de la régulation de la stabilité de la protéine, et *in fine*, du niveau cellulaire de Spt6. Nos analyses soulignent toutefois que la régulation de la transcription et de la préservation de la structure chromatinienne par CK2 n'est pas uniquement dépendante de la modulation de Spt6. L'interaction de CK2 avec des facteurs d'élongation tels que CHD1, Spt16 ou Spt5, très fortement impliqués dans l'organisation des nucléosomes et la suppression de la transcription cryptique, ouvre des pistes d'analyses futures pour comprendre le rôle global de CK2 dans ce contexte.

Enfin, CK2 provoque une accumulation de transcrits aberrants sans pour autant gravement altérer la transcription des ARNm. De façon surprenante, nous avons observé une augmentation de l'occupation à la chromatine de complexes transcriptionnels associés à une baisse globale de la phosphorylation sur les sérines 2 du CTD de l'ARNPII en absence de CK2. Nos résultats renforcent en outre des données de la littérature en soulignant que le complexe PAF et cette kinase ont une relation fonctionnelle complexe, ce qui place CK2 au cœur du processus d'élongation transcriptionnelle.

Les erreurs de l'ARNPII, qualifiées de bruit de fond transcriptionnel, existent de façon normale dans les cellules, mais sont limitées en amont de la transcription par les barrières chromatinienes, ou en aval par l'exosome. Bien qu'elle représente vraisemblablement une perte d'énergie pour la cellule, et paraît donc indésirable, l'accumulation de transcrits aberrants n'a qu'un impact modéré sur la transcription canonique en conditions cellulaires métaboliques de base. Nous proposons un modèle dans lequel en absence de CK2, la désorganisation de la chromatine conduit à une distribution plus anarchique de l'ARNPII qui détourne et titre sa fonction au profit de la transcription cryptique, et ayant un effet délétère vis-à-vis de la réaction d'adaptation cellulaire à des signaux extérieurs ou à des conditions de stress (Fig. 4.3). Dans ce contexte, CK2 et la phosphorylation de Spt6

apparaissent essentiels pour l'efficacité de la réponse transcriptionnelle à des signaux environnementaux, en optimisant l'action de l'ARNPII dans la cellule.

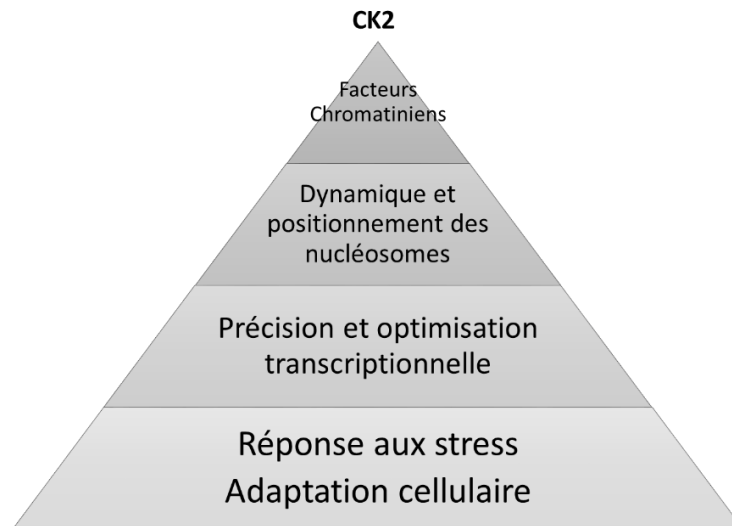


Figure 4.3 : CK2 favorise l'efficacité de la réponse transcriptionnelle aux signaux extérieurs en optimisant la réponse transcriptionnelle via une bonne organisation de la structure de la chromatine

Bibliographie

- Adelman, K., Lis, J.T., 2012. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat. Rev. Genet.* 13(10): 720-31. doi; 10.1038/nrg3293
- Albuquerque, C.P., Smolka, M.B., Payne, S.H., Bafna, V., Eng, J., Zhou, H., 2008. A Multidimensional Chromatography Technology for In-depth Phosphoproteome Analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 1389–1396. doi:10.1074/mcp.M700468-MCP200
- Altaf, M., Auger, A., Monnet-Saksouk, J., Brodeur, J., Piquet, S., Cramet, M., Bouchard, N., Lacoste, N., Utley, R.T., Gaudreau, L., Côté, J., 2010. NuA4-dependent acetylation of nucleosomal histones H4 and H2A directly stimulates incorporation of H2A.Z by the SWR1 complex. *J. Biol. Chem.* 285, 15966–77. doi:10.1074/jbc.M110.117069
- Andrews, A.J., Chen, X., Zevin, A., Stargell, L.A., Luger, K., 2010. The histone chaperone Nap1 promotes nucleosome assembly by eliminating nonnucleosomal histone DNA interactions. *Mol. Cell* 37, 834–42. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.037
- Andrews, A.J., Downing, G., Brown, K., Park, Y.-J., Luger, K., 2008. A Thermodynamic Model for Nap1-Histone Interactions. *J. Biol. Chem.* 283, 32412–32418. doi:10.1074/jbc.M805918200
- Andrulis, E.D., Guzmán, E., Döring, P., Werner, J., Lis, J.T., 2000. High-resolution localization of *Drosophila* Spt5 and Spt6 at heat shock genes in vivo: Roles in promoter proximal pausing and transcription elongation. *Genes Dev.* 14, 2635–2649. doi:10.1101/gad.844200
- Andrulis, E.D., Werner, J., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lis, J.T., 2002. The RNA processing exosome is linked to elongating RNA polymerase II in *Drosophila*. *Nature* 420, 837–41. doi:10.1038/nature01181
- Ardehali, M.B., Yao, J., Adelman, K., Fuda, N.J., Petesch, S.J., Webb, W.W., Lis, J.T., 2009. Spt6 enhances the elongation rate of RNA polymerase II in vivo. *EMBO J.* 28, 1067–1077. doi:10.1038/emboj.2009.56
- Avvakumov, N., Nourani, A., Côté, J., 2011. Histone Chaperones: Modulators of Chromatin Marks. *Mol. Cell* 41, 502–514. doi:10.1016/j.molcel.2011.02.013
- Badis, G., Chan, E.T., van Bakel, H., Pena-Castillo, L., Tillo, D., Tsui, K., Carlson, C.D., Gossett, A.J., Hasinoff, M.J., Warren, C.L., Gebbia, M., Talukder, S., Yang, A., Mnaimneh, S., Terterov, D., Coburn, D., Li Yeo, A., Yeo, Z.X., Clarke, N.D., Lieb, J.D., Ansari, A.Z., Nislow, C., Hughes, T.R., 2008. A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Mol. Cell* 32, 878–87. doi:10.1016/j.molcel.2008.11.020
- Bannister, A.J., Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395. doi:10.1038/cr.2011.22
- Bartholomew, B., 2014. ISWI chromatin remodeling: One primary actor or a coordinated effort? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 24, 150–155. doi:10.1016/j.sbi.2014.01.010
- Barz, T., 2003. Genome-wide expression screens indicate a global role for protein kinase CK2 in chromatin remodeling. *J. Cell Sci.* 116, 1563–1577. doi:10.1242/jcs.00352
- Basnet, H., Su, X.B., Tan, Y., Meisenhelder, J., Merkurjev, D., Ohgi, K.A., Hunter, T., Pillus, L., Rosenfeld, M.G., 2014. Tyrosine phosphorylation of histone H2A by CK2 regulates transcriptional

elongation. *Nature* 516, 267–271. doi:10.1038/nature13736

Bataille, A.R., Jeronimo, C., Jacques, P.-É., Laramée, L., Fortin, M.-È., Forest, A., Bergeron, M., Hanes, S.D., Robert, F., 2012. A Universal RNA Polymerase II CTD Cycle Is Orchestrated by Complex Interplays between Kinase, Phosphatase, and Isomerase Enzymes along Genes. *Mol. Cell* 45, 158–170. doi:10.1016/j.molcel.2011.11.024

Bedard, L.G., Dronamraju, R., Kerschner, J.L., Hunter, G.O., Axley, E.D., Boyd, A.K., Strahl, B.D., Mosley, A.L., 2016. Quantitative Analysis of Dynamic Protein Interactions during Transcription Reveals a Role for Casein Kinase II in Polymerase-associated Factor (PAF) Complex Phosphorylation and Regulation of Histone H2B Monoubiquitylation. *J. Biol. Chem.* 291, 13410–20. doi:10.1074/jbc.M116.727735

Belotserkovskaya, R., 2003. FACT Facilitates Transcription-Dependent Nucleosome Alteration. *Science* (80-.). 301, 1090–1093. doi:10.1126/science.1085703

Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M., Reinberg, D., 2003. FACT Facilitates Nucleosome Alteration. *Science* (80-.). 301, 1090–1093.

Bernstein, B.E., Liu, C., Humphrey, E.L., Perlstein, E.O., Schreiber, S.L., 2004. Global nucleosome occupancy in yeast. *Genome Biol.* 5, R62. doi:10.1186/gb-2004-5-9-r62

Bhat, W., Boutin, G., Rufiange, A., Nourani, A., 2013. Casein kinase 2 associates with the yeast chromatin reassembly factor Spt2/Sin1 to regulate its function in the repression of spurious transcription. *Mol. Cell. Biol.* 33, 4198–211. doi:10.1128/MCB.00525-13

Biswas, D., Dutta-Biswas, R., Stillman, D.J., 2007. Chd1 and yFACT act in opposition in regulating transcription. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6279–87. doi:10.1128/MCB.00978-07

Biswas, D., Yu, Y., Prall, M., Formosa, T., Stillman, D.J., 2005. The Yeast FACT Complex Has a Role in Transcriptional Initiation The Yeast FACT Complex Has a Role in Transcriptional Initiation †. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5812–5822. doi:10.1128/MCB.25.14.5812

Böhm, V., Hieb, A.R., Andrews, A.J., Gansen, A., Rocker, A., Tòth, K., Luger, K., Langowski, J., 2011. Nucleosome accessibility governed by the dimer / tetramer interface. *Nucleic Acids Res.* 39, 3093–3102. doi:10.1093/nar/gkq1279

Bondarenko, V.A., Steele, L.M., Ujvári, A., Gaykalova, D.A., Kulaeva, O.I., Polikanov, Y.S., Luse, D.S., Studitsky, V.M., 2006. Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* 24, 469–79. doi:10.1016/j.molcel.2006.09.009

Bonev, B., Cavalli, G., 2016. Organization and function of the 3D genome. *Nat. Rev. Genet.* 17, 661–678. doi:10.1038/nrg.2016.112

Bonifer, C., 1999. Long-distance chromatin mechanisms controlling tissue-specific gene locus activation. *Science* (80-.). 238, 277–289.

Bortvin, A., Winston, F., 1996. Evidence That Spt6p Controls Chromatin Structure by a Direct Interaction with Histones. *Science* (80-.). 272, 1473–1476.

Bouazoune, K., Brehm, A., 2005. dMi-2 chromatin binding and remodeling activities are regulated by dCK2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 280, 41912–41920. doi:10.1074/jbc.M507084200

- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., Tollervey, D., 2000. Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* 102, 765–775. doi:10.1016/S0092-8674(00)00065-9
- Brès, V., Yoh, S.M., Jones, K.A., 2008. The multi-tasking P-TEFb complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 334–340. doi:10.1016/j.ceb.2008.04.008
- Brewster, N.K., Johnston, G.C., Singer, R.A., 2001. A bipartite yeast SSRP1 analog comprised of Pob3 and Nhp6 proteins modulates transcription. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3491–502. doi:10.1128/MCB.21.10.3491-3502.2001
- Buchou, T., Vernet, M., Blond, O., Jensen, H.H., Pointu, H., Olsen, B.B., Cochet, C., Issinger, O.-G., Boldyreff, B., 2003. Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol.* 23, 908–15. doi:10.1128/MCB.23.3.908
- Buratowski, S., 2005. Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 257–261. doi:10.1016/j.ceb.2005.04.003
- Buratowski, S., 2003. The CTD code. *Nat. Struct. Biol.* 10, 679–680. doi:10.1038/nsb0903-679
- Buratowski, S., Sharp, P.A., 1990. Transcription Initiation Complexes and Upstream Activation with RNA Polymerase II Lacking the C-Terminal Domain of the Largest Subunit. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5562–5564.
- Burgess, R.J., Zhang, Z., 2013. Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 14–22. doi:10.1038/nsmb.2461
- Burnett, G., Kennedy, E.P., 1954. And eugene p. kennedy. *Cancer* 969–980.
- Burugula, B.B., Jeronimo, C., Pathak, R., Jones, J.W., Robert, F., Govind, C.K., 2014. Histone Deacetylases and Phosphorylated Polymerase II C-Terminal Domain Recruit Spt6 for Cotranscriptional Histone Reassembly. *Mol. Cell. Biol.* 34, 4115–4129. doi:10.1128/MCB.00695-14
- Cairns, B.R., 2009. The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* 461, 193–8. doi:10.1038/nature08450
- Cairns, B.R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B., Kornberg, R.D., 1996. RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* 87, 1249–60.
- Calvert, M.E.K., Keck, K.M., Ptak, C., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Pemberton, L.F., 2008. Phosphorylation by casein kinase 2 regulates Nap1 localization and function. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1313–1325. doi:10.1128/MCB.01035-07
- Camblong, J., Beyrouthy, N., Guffanti, E., Schlaepfer, G., Steinmetz, L.M., Stutz, F., 2009. Trans-acting antisense RNAs mediate transcriptional gene cosuppression in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* 23, 1534–1545. doi:10.1101/gad.522509
- Camblong, J., Iglesias, N., Fickentscher, C., Dieppo, G., Stutz, F., 2007. Antisense RNA Stabilization Induces Transcriptional Gene Silencing via Histone Deacetylation in *S. cerevisiae*. *Cell* 131, 706–717. doi:10.1016/j.cell.2007.09.014

- Carey, M., Li, B., Workman, J.L., 2006. RSC exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to RNA polymerase II elongation. *Mol. Cell* 24, 481–7. doi:10.1016/j.molcel.2006.09.012
- Carrozza, M.J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S.K., Lee, K.K., Shia, W.-J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M.P., Workman, J.L., 2005. Histone H3 Methylation by Set2 Directs Deacetylation of Coding Regions by Rpd3S to Suppress Spurious Intragenic Transcription. *Cell* 123, 581–592. doi:10.1016/j.cell.2005.10.023
- Chai, B., Huang, J., Cairns, B.R., Laurent, B.C., 2005. Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes Dev.* 19, 1656–61. doi:10.1101/gad.1273105
- Chakravarthy, S., Park, Y.-J., Chodaparambil, J., Edayathumangalam, R.S., Luger, K., 2005. Structure and dynamic properties of nucleosome core particles. *FEBS Lett.* 579, 895–898. doi:10.1016/j.febslet.2004.11.030
- Chapman, R.D., Heidemann, M., Hintermair, C., Eick, D., 2008. Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends Genet.* 24, 289–296. doi:10.1016/j.tig.2008.03.010
- Chen, P., Zhao, J., Wang, Y., Wang, M., Long, H., Liang, D., Huang, L., Wen, Z., Li, W., Li, X., Feng, H., Zhao, H., Zhu, P., Li, M., Wang, Q., Li, G., 2013. H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin. *Genes Dev.* 27, 2109–24. doi:10.1101/gad.222174.113
- Chen, S., Rufiange, A., Huang, H., Rajashankar, K.R., Nourani, A., Patel, D.J., 2015. Structure-function studies of histone H3/H4 tetramer maintenance during transcription by chaperone Spt2. *Genes Dev.* 29, 1326–40. doi:10.1101/gad.261115.115
- Cheung, V., Chua, G., Batada, N.N., Landry, C.R., Michnick, S.W., Hughes, T.R., Winston, F., 2008. Chromatin- and transcription-related factors repress transcription from within coding regions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *PLoS Biol.* 6, 2550–2562. doi:10.1371/journal.pbio.0060277
- Chu, Y., Simic, R., Warner, M.H., Arndt, K.M., Prelich, G., 2007. Regulation of histone modification and cryptic transcription by the Bur1 and Paf1 complexes. *EMBO J.* 26, 4646–56. doi:10.1038/sj.emboj.7601887
- Chu, Y., Sutton, A., Sternglanz, R., Prelich, G., 2006. The BUR1 cyclin-dependent protein kinase is required for the normal pattern of histone methylation by SET2. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3029–38. doi:10.1128/MCB.26.8.3029-3038.2006
- Clapier, C.R., Cairns, B.R., 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Ann Rev Biochem* 78, 273–304. doi:10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223
- Clark-Adams, C., Winston, F., 1987. The *SPT6* gene is essential for growth and is required for delta-mediated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 679–686.
- Close, D., Johnson, S.J., Sdano, M.A., McDonald, S.M., Robinson, H., Formosa, T., Hill, C.P., 2011. Crystal structures of the *S. cerevisiae* Spt6 core and C-terminal tandem SH2 domain. *J. Mol. Biol.* 408, 697–713. doi:10.1016/j.jmb.2011.03.002

Cramer, P., Cramer, P., Bushnell, D.A., Kornberg, R.D., 2001. Structural Basis of Transcription : RNA Polymerase II at 2.8 Ångstrom Resolution 1863, 1863–1877. doi:10.1126/science.1059493

D'Arcy, S., Martin, K.W., Panchenko, T., Chen, X., Bergeron, S., Stargell, L.A., Black, B.E., Luger, K., 2013. Chaperone Nap1 Shields Histone Surfaces Used in a Nucleosome and Can Put H2A-H2B in an Unconventional Tetrameric Form. *Mol. Cell* 51, 662–677. doi:10.1016/j.molcel.2013.07.015

Damelin, M., Simon, I., Moy, T.I., Wilson, B., Komili, S., Tempst, P., Roth, F.P., Young, R.A., Cairns, B.R., Silver, P.A., 2002. The genome-wide localization of Rsc9, a component of the RSC chromatin-remodeling complex, changes in response to stress. *Mol. Cell* 9, 563–73.

Dastidar, E.G., Dayer, G., Holland, Z.M., Dorin-Semblat, D., Claes, A., Chene, A., Sharma, A., Hamelin, R., Moniatte, M., Lopez-Rubio, J.-J., Scherf, A., Doerig, C., 2012. Involvement of Plasmodium falciparum protein kinase CK2 in the chromatin assembly pathway. *BMC Biol.* 10, 5. doi:10.1186/1741-7007-10-5

Davie, J.K., Kane, C.M., 2000. Genetic interactions between TFIIS and the Swi-Snf chromatin-remodeling complex. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5960–73. doi:10.1128/MCB.20.16.5960-5973.2000

de Jonge, W.J., O'Duibhir, E., Lijnzaad, P., van Leenen, D., Groot Koerkamp, M.J., Kemmeren, P., Holstege, F.C., 2017. Molecular mechanisms that distinguish TFIID housekeeping from regulatable SAGA promoters. *EMBO J.* 36, 274–290. doi:10.15252/embj.201695621

DeGennaro, C.M., Alver, B.H., Marguerat, S., Stepanova, E., Davis, C.P., Bahler, J., Park, P.J., Winston, F., 2013. Spt6 Regulates Intragenic and Antisense Transcription, Nucleosome Positioning, and Histone Modifications Genome-Wide in Fission Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 33, 4779–4792. doi:10.1128/MCB.01068-13

Denis, C.L., 1984. Identification of new genes involved in the regulation of yeast alcohol dehydrogenase II. *Genetics* 108, 833–844.

Deplus, R., Blanchon, L., Rajavelu, A., Boukaba, A., Defrance, M., Luciani, J., Roth, F., Dedeurwaerder, S., Denis, H., Brinkman, A.B., Simmer, F., Müller, F., Bertin, B., Berdasco, M., Putmans, P., Calonne, E., Litchfield, D.W., De Launoit, Y., Jurkowski, T.P., Stunnenberg, H.G., Bock, C., Sotiriou, C., Fraga, M.F., Esteller, M., Jeltsch, A., Fuks, F., 2014. Regulation of DNA methylation patterns by CK2-mediated phosphorylation of Dnmt3a. *Cell Rep.* 8, 743–753. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.048

Diebold, M.L., Loeliger, E., Koch, M., Winston, F., Cavarelli, J., Romier, C., 2010. Noncanonical tandem SH2 enables interaction of elongation factor Spt6 with RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 285, 38389–38398. doi:10.1074/jbc.M110.146696

Dion, M.F., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Friedman, N., Rando, O.J., 2007. Dynamics of Replication-Independent Histone Turnover in Budding Yeast. *Science* (80-). 315, 1405–1408. doi:10.1126/science.1134053

Djebali, S., Davis, C.A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, ... Giddings, M.C., Ruan, Y., Wold, B., Carninci, P., Guigo, R., Gingeras, T.R., 2012. Landscape of transcription in human cells 489, 101–108. doi:10.1038/nature11233

Driscoll, R., Hudson, A., Jackson, S.P., 2007. Yeast Rtt109 promotes genome stability by

acetylating histone H3 on lysine 56. *Science* 315, 649–52. doi:10.1126/science.1135862

Dronamraju, R., Strahl, B.D., 2014. A feed forward circuit comprising Spt6, Ctk1 and PAF regulates Pol II CTD phosphorylation and transcription elongation. *Nucleic Acids Res.* 42, 870–881. doi:10.1093/nar/gkt1003

Drouin, S., Laramée, L., Jacques, P.-É., Forest, A., Bergeron, M., Robert, F., 2010. DSIF and RNA Polymerase II CTD Phosphorylation Coordinate the Recruitment of Rpd3S to Actively Transcribed Genes. *PLoS Genet.* 6, e1001173. doi:10.1371/journal.pgen.1001173

Duncan, J.S., Litchfield, D.W., 2008. Too much of a good thing: The role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1784, 33–47. doi:10.1016/j.bbapap.2007.08.017

Endoh, M., Zhu, W., Hasegawa, J., Watanabe, H., Kim, D.-K., Aida, M., Inukai, N., Narita, T., Yamada, T., Furuya, A., Sato, H., Yamaguchi, Y., Mandal, S.S., Reinberg, D., Wada, T., Handa, H., 2004. Human Spt6 stimulates transcription elongation by RNA polymerase II in vitro. *Mol. Cell Biol.* 24, 3324–36. doi:10.1128/MCB.24.8.3324

Erdel, F., Rippe, K., 2011. Chromatin remodelling in mammalian cells by ISWI-type complexes - where, when and why? *FEBS J.* 278, 3608–3618. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08282.x

Ferrari, P., Strubin, M., 2015. Uncoupling histone turnover from transcription-associated histone H3 modifications. *Nucleic Acids Res.* 43, 3972–3985. doi:10.1093/nar/gkv282

Filipescu, D., Szenker, E., Almouzni, G., 2013. Developmental roles of histone H3 variants and their chaperones. *Trends Genet.* 29, 630–640. doi:10.1016/j.tig.2013.06.002

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811. doi:10.1038/35888

Fischbeck, J.A., Kraemer, S.M., Stargell, L.A., 2002. SPN1, a conserved gene identified by suppression of a postrecruitment-defective yeast TATA-binding protein mutant. *Genetics* 162, 1605–1616.

Fishburn, J., Tomko, E., Galburt, E., Hahn, S., 2015. Double-stranded DNA translocase activity of transcription factor TFIIF and the mechanism of RNA polymerase II open complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 3961–3966. doi:10.1073/pnas.1417709112

Fleming, A.B., Kao, C.-F., Hillyer, C., Pikaart, M., Osley, M.A., 2008. H2B Ubiquitylation Plays a Role in Nucleosome Dynamics during Transcription Elongation. *Mol. Cell* 31, 57–66. doi:10.1016/j.molcel.2008.04.025

Formosa, T., 2012. The role of FACT in making and breaking nucleosomes. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1819, 247–255. doi:10.1016/j.bbagr.2011.07.009

Fussner, E., Strauss, M., Djuric, U., Li, R., Ahmed, K., Hart, M., Ellis, J., Bazett-Jones, D.P., 2012. Open and closed domains in the mouse genome are configured as 10-nm chromatin fibres. *EMBO Rep.* 13, 992–6. doi:10.1038/embor.2012.139

Gambus, A., Jones, R.C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R.D.,

- Labib, K., 2006. GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat. Cell Biol.* 8, 358–366. doi:10.1038/ncb1382
- Gavin, A.-C., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., ... Neubauer, G., Superti-Furga, G., 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141–147. doi:10.1038/415141a
- Gaykalova, D.A., Kulaeva, O.I., Volokh, O., Shaytan, A.K., Hsieh, F.-K., Kirpichnikov, M.P., Sokolova, O.S., Studitsky, V.M., 2015. Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E5787–E5795. doi:10.1073/pnas.1508371112
- Gérard, A., Ségéral, E., Naughtin, M., Abdouni, A., Charmeteau, B., Cheynier, R., Rain, J.-C., Emiliani, S., 2015. The Integrase Cofactor LEDGF/p75 Associates with Iwsl and Spt6 for Postintegration Silencing of HIV-1 Gene Expression in Latently Infected Cells. *Cell Host Microbe* 17, 107–117. doi:10.1016/j.chom.2014.12.002
- Gilmour, D.S., Lis, J.T., 1986. RNA polymerase II interacts with the promoter region of the noninduced hsp70 gene in *Drosophila melanogaster* cells. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3984–9. doi:10.1128/MCB.6.11.3984
- Ginsburg, D.S., Govind, C.K., Hinnebusch, A.G., 2009. NuA4 lysine acetyltransferase Esa1 is targeted to coding regions and stimulates transcription elongation with Gcn5. *Mol. Cell. Biol.* 29, 6473–87. doi:10.1128/MCB.01033-09
- Gkikopoulos, T., Schofield, P., Singh, V., Pinskaya, M., Mellor, J., Smolle, M., Workman, J.L., Barton, G.J., Owen-Hughes, T., 2011. A role for Snf2-related nucleosome-spacing enzymes in genome-wide nucleosome organization. *Science* 333, 1758–60. doi:10.1126/science.1206097
- Govind, C.K., Qiu, H., Ginsburg, D.S., Ruan, C., Hofmeyer, K., Hu, C., Swaminathan, V., Workman, J.L., Li, B., Hinnebusch, A.G., 2010. Phosphorylated Pol II CTD Recruits Multiple HDACs, Including Rpd3C(S), for Methylation-Dependent Deacetylation of ORF Nucleosomes. *Mol. Cell* 39, 234–246. doi:10.1016/j.molcel.2010.07.003
- Govind, C.K., Zhang, F., Qiu, H., Hofmeyer, K., Hinnebusch, A.G., 2007. Gcn5 Promotes Acetylation, Eviction, and Methylation of Nucleosomes in Transcribed Coding Regions. *Mol. Cell* 25, 31–42. doi:10.1016/j.molcel.2006.11.020
- Grunstein, M., 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349–352. doi:10.1038/38664
- Gurard-Levin, Z.A., Quivy, J.-P., Almouzni, G., 2014. Histone Chaperones: Assisting Histone Traffic and Nucleosome Dynamics. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 487–517. doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035536
- Gyenis, L., Litchfield, D.W., 2008. The emerging CK2 interactome: Insights into the regulation and functions of CK2. *Mol. Cell. Biochem.* 316, 5–14. doi:10.1007/s11010-008-9830-5
- Hainer, S.J., Gu, W., Carone, B.R., Landry, B.D., Rando, O.J., Mello, C.C., Fazio, T.G., 2015. Suppression of pervasive noncoding transcription in embryonic stem cells by esBAF. *Genes Dev.* 29, 362–378. doi:10.1101/gad.253534.114
- Hammond, C.M., Strømme, C.B., Huang, H., Patel, D.J., Groth, A., 2017. Histone chaperone

- networks shaping chromatin function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* doi:10.1038/nrm.2016.159
- Harlen, K.M., Churchman, L.S., 2017. The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* doi:10.1038/nrm.2017.10
- Harlen, K.M., Trotta, K.L., Smith, E.E., Mosaheb, M.M., Fuchs, S.M., Churchman, L.S., 2016. Comprehensive RNA Polymerase II Interactomes Reveal Distinct and Varied Roles for Each Phospho-CTD Residue. *Cell Rep.* 15, 2147–58. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.010
- Hartley, P.D., Madhani, H.D., 2009. Mechanisms that specify promoter nucleosome location and identity. *Cell* 137, 445–58. doi:10.1016/j.cell.2009.02.043
- Hartzog, G. a, Wada, T., Handa, H., Winston, F., 1998. Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by {RNA} polymerase II in \textit{Saccharomyces cerevisiae}. *Genes Dev* 12, 357–369. doi:10.1101/gad.12.3.357
- Hewawasam, G.S., Mattingly, M., Venkatesh, S., Zhang, Y., Florens, L., Workman, J.L., Gerton, J.L., 2014. Phosphorylation by casein kinase 2 facilitates Psh1 protein-assisted degradation of Cse4 protein. *J. Biol. Chem.* 289, 29297–29309. doi:10.1074/jbc.M114.580589
- Holliday, R., 1994. Epigenetics : An Overview. *Dev. Genet.* 453457. doi:10.1002/dvg.1020150602
- Hondele, M., Stuwe, T., Hassler, M., Halbach, F., Bowman, A., Zhang, E.T., Nijmeijer, B., Kothhoff, C., Rybin, V., Amlacher, S., Hurt, E., Ladurner, A.G., 2013. Structural basis of histone H2A–H2B recognition by the essential chaperone FACT. *Nature* 499, 111–114. doi:10.1038/nature12242
- Hong, L., Schroth, G.P., Matthews, H.R., Yau, P., Bradbury, E.M., 1993. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. *J. Biol. Chem.* 268, 305–314.
- Hsieh, F.-K., Kulaeva, O.I., Patel, S.S., Dyer, P.N., Luger, K., Reinberg, D., Studitsky, V.M., 2013. Histone chaperone FACT action during transcription through chromatin by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 7654–7659. doi:10.1073/pnas.1222198110
- Hsu, L.M., 2009. Monitoring abortive initiation. *Methods* 47, 25–36. doi:10.1016/j.ymeth.2008.10.010
- Huang, H., Strømme, C.B., Saredi, G., Hödl, M., Strandsby, A., González-Aguilera, C., Chen, S., Groth, A., Patel, D.J., 2015. A unique binding mode enables MCM2 to chaperone histones H3-H4 at replication forks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 618–26. doi:10.1038/nsmb.3055
- Hwang, W.W., Venkatasubrahmanyam, S., Ianculescu, A.G., Tong, A., Boone, C., Madhani, H.D., 2003. A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol. Cell* 11, 261–6.
- Ivanovska, I., Jacques, P.-É., Rando, O.J., Robert, F., Winston, F., 2011. Control of chromatin structure by spt6: different consequences in coding and regulatory regions. *Mol. Cell. Biol.* 31, 531–541. doi:10.1128/MCB.01068-10
- Izban, M.G., Luse, D.S., 1991. Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing. *Genes Dev.* 5, 683–96.

- Jackson, V., 1990. In Vivo Studies on the Dynamics of Histone-DNA Interaction: Evidence for Nucleosome Dissolution during Replication and Transcription and a Low Level of Dissolution Independent of Both. *Biochemistry* 29, 719–731.
- Jacob, F., Monod, J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3, 318–356. doi:10.1016/S0022-2836(61)80072-7
- Jaehning, J.A., 2010. The Paf1 complex: platform or player in RNA polymerase II transcription? *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 379–88. doi:10.1016/j.bbagr.2010.01.001
- Jamai, A., Puglisi, A., Strubin, M., 2009. Histone Chaperone Spt16 Promotes Redeposition of the Original H3-H4 Histones Evicted by Elongating RNA Polymerase. *Mol. Cell* 35, 377–383. doi:10.1016/j.molcel.2009.07.001
- Jeronimo, C., Bataille, A.R., Robert, F., 2013. The Writers, Readers, and Functions of the RNA Polymerase II C-Terminal Domain Code. *Chem. Rev.* 113, 8491–8522. doi:10.1021/cr4001397
- Jeronimo, C., Watanabe, S., Kaplan, C.D., Peterson, C.L., Robert, F., 2015. The Histone Chaperones FACT and Spt6 Restrict H2A.Z from Intragenic Locations. *Mol. Cell* 58, 1113–1123. doi:10.1016/j.molcel.2015.03.030
- Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K., Felsenfeld, G., 2009. H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark “nucleosome-free regions” of active promoters and other regulatory regions. *Nat. Genet.* 41, 941–5. doi:10.1038/ng.409
- Johnson, S.J., Close, D., Robinson, H., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., Hill, C.P., 2008. Crystal Structure and RNA Binding of the Tex Protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 377, 1460–1473. doi:10.1016/j.jmb.2008.01.096
- Johnston, I.M., Allison, S.J., Morton, J.P., Schramm, L., Scott, P.H., White, R.J., 2002. CK2 Forms a Stable Complex with TFIIB and Activates RNA Polymerase III Transcription in Human Cells. *Mol. Cell Biol.* 22, 3757–3768. doi:10.1128/MCB.22.11.3757
- Jonkers, I., Kwak, H., Lis, J.T., 2014. Genome-wide dynamics of Pol II elongation and its interplay with promoter proximal pausing, chromatin, and exons. *Elife* 3. doi:10.7554/eLife.02407
- Jónsson, Z.O., Jha, S., Wohlschlegel, J.A., Dutta, A., 2004. Rvb1p/Rvb2p Recruit Arp5p and Assemble a Functional Ino80 Chromatin Remodeling Complex. *Mol. Cell* 16, 465–477. doi:10.1016/j.molcel.2004.09.033
- Joshi, A.A., Struhl, K., 2005. Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol. Cell* 20, 971–8. doi:10.1016/j.molcel.2005.11.021
- Kamakaka, R.T., Biggins, S., 2005. Histone variants : deviants. *Genes Dev.* 19, 295–310. doi:10.1101/gad.1272805.sealing
- Kaplan, C.D., Laprade, L., Winston, F., 2003. Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. *Science* 301, 1096–9. doi:10.1126/science.1087374
- Katan-Khaykovich, Y., Struhl, K., 2011. Splitting of H3-H4 tetramers at transcriptionally active genes undergoing dynamic histone exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1296–301.

doi:10.1073/pnas.1018308108

Kato, H., Okazaki, K., Iida, T., Nakayama, J.-I., Murakami, Y., Urano, T., 2013. Spt6 prevents transcription-coupled loss of posttranslationally modified histone H3. *Sci. Rep.* 3, 2186. doi:10.1038/srep02186

Kent, N.A., Chambers, A.L., Downs, J.A., 2007. Dual chromatin remodeling roles for RSC during DNA double strand break induction and repair at the yeast MAT locus. *J. Biol. Chem.* 282, 27693–701. doi:10.1074/jbc.M704707200

Keogh, M.-C., Kurdistani, S.K., Morris, S.A., Ahn, S.H., Podolny, V., Collins, S.R., Schuldiner, M., Chin, K., Punna, T., Thompson, N.J., Boone, C., Emili, A., Weissman, J.S., Hughes, T.R., Strahl, B.D., Grunstein, M., Greenblatt, J.F., Buratowski, S., Krogan, N.J., 2005. Cotranscriptional Set2 Methylation of Histone H3 Lysine 36 Recruits a Repressive Rpd3 Complex. *Cell* 123, 593–605. doi:10.1016/j.cell.2005.10.025

Kim, M., Krogan, N.J., Vasiljeva, L., Rando, O.J., Nedeja, E., Greenblatt, J.F., Buratowski, S., 2004. The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* 432, 517–22. doi:10.1038/nature03041

Kim, T.-K., Hemberg, M., Gray, J.M., Costa, A.M., Bear, D.M., Wu, J., Harmin, D.A., Laptewicz, M., Barbara-Haley, K., Kuersten, S., Markenscoff-Papadimitriou, E., Kuhl, D., Bito, H., Worley, P.F., Kreiman, G., Greenberg, M.E., 2010. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* 465, 182–7. doi:10.1038/nature09033

Kim, T., Buratowski, S., n.d. Dimethylation of H3K4 by Set1 Recruits the Set3 Histone Deacetylase Complex to 5' Transcribed Regions. *Cell* 137, 259–272. doi:10.1016/j.cell.2009.02.045

Kim, T., Xu, Z., Clauder-Münster, S., Steinmetz, L.M., Buratowski, S., 2012. Set3 HDAC Mediates Effects of Overlapping Noncoding Transcription on Gene Induction Kinetics. *Cell* 150, 1158–1169. doi:10.1016/j.cell.2012.08.016

Kim, T.H., Barrera, L.O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M.A., Richmond, T.A., Wu, Y., Green, R.D., Ren, B., 2005. A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436, 876–880. doi:10.1038/nature03877

Kimura, H., Cook, P.R., 2001. Kinetics of Core Histones in Living Human Cells. *J. Cell Biol.* 153, 1341–1354. doi:10.1083/jcb.153.7.1341

Kingston, R.E., Narlikar, G.J., 1999. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 13, 2339–52.

Kireeva, M.L., Hancock, B., Cremona, G.H., Walter, W., Studitsky, V.M., Kashlev, M., 2005. Nature of the Nucleosomal Barrier to RNA Polymerase II. *Mol. Cell* 18, 97–108. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.027

Kireeva, M.L., Walter, W., Tchernajenko, V., Bondarenko, V., Kashlev, M., Studitsky, V.M., 2002. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription. *Mol. Cell* 9, 541–52.

Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D., 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. doi:10.1371/journal.pbio.0020131

Korber, P., Barbaric, S., Luckenbach, T., Schmid, A., Schermer, U.J., Blaschke, D., Hörz, W., 2006. The histone chaperone Asf1 increases the rate of histone eviction at the yeast PHO5 and PHO8 promoters. *J. Biol. Chem.* 281, 5539–45. doi:10.1074/jbc.M513340200

Kornberg, R.D., 1977. Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 931–54. doi:10.1146/annurev.bi.46.070177.004435

Kornberg, R.D., 1974. Chromatin Structure : A Repeating Unit of Histones and DNA Published by : American Association for the Advancement of Science Linked references are available on JSTOR for this article : Chromatin Structure : A Repeating Unit of Histones and DNA *Chromatin. Science* 184, 868–871.

Kouskouti, A., Talianidis, I., 2005. Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation. *EMBO J.* 24, 347–357. doi:10.1038/sj.emboj.7600516

Kouzarides, T., 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005

Kristjuhan, A., Svejstrup, J.Q., 2004. Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin in vivo. *EMBO J.* 23, 4243–52. doi:10.1038/sj.emboj.7600433

Kristjuhan, A., Walker, J., Suka, N., Grunstein, M., Roberts, D., Cairns, B.R., Svejstrup, J.Q., 2002. Transcriptional inhibition of genes with severe histone h3 hypoacetylation in the coding region. *Mol. Cell* 10, 925–33.

Krogan, N.J., Kim, M., Ahn, S.H., Zhong, G., Kobor, M.S., Cagney, G., Emili, A., Shilatifard, A., Buratowski, S., Greenblatt, J.F., 2002. RNA Polymerase II Elongation Factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a Targeted Proteomics Approach. *Society* 22, 6979–6992. doi:10.1128/MCB.22.20.6979

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., 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, 4207–18.

Kulaeva, O.I., Hsieh, F.-K., Chang, H.-W., Luse, D.S., Studitsky, V.M., 2013. Mechanism of transcription through a nucleosome by RNA polymerase II. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1829, 76–83. doi:10.1016/j.bbagr.2012.08.015

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, ... Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J., International Human Genome Sequencing, C., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921. doi:10.1038/35057062

Landesman-Bollag, E., Channavajhala, P.L., Cardiff, R.D., Seldin, D.C., 1998. p53 deficiency and misexpression of protein kinase CK2alpha collaborate in the development of thymic lymphomas in mice. *Oncogene* 16, 2965–2974. doi:10.1038/sj.onc.1201854

- Landesman-Bollag, E., Song, D.H., Romieu-Mourez, R., Sussman, D.J., Cardiff, R.D., Sonenshein, G.E., Seldin, D.C., 2001. Protein kinase CK2: Signaling and tumorigenesis in the mammary gland. *Mol. Cell. Biochem.* 227, 153–165. doi:10.1023/A:1013108822847
- Larschan, E., Winston, F., 2001. The *S. cerevisiae* SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. *Genes Dev.* 15, 1946–1956. doi:10.1101/gad.911501
- Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D., Finch, J.T., 1978. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275, 416–20.
- Lee, C.-H., Wu, J., Li, B., 2013. Chromatin Remodelers Fine-Tune H3K36me-Directed Deacetylation of Neighbor Nucleosomes by Rpd3S. *Mol. Cell* 52, 255–263. doi:10.1016/j.molcel.2013.08.024
- Lee, C.-K., Shibata, Y., Rao, B., Strahl, B.D., Lieb, J.D., 2004. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat. Genet.* 36, 900–905. doi:10.1038/ng1400
- Lee, J.-S., Garrett, A.S., Yen, K., Takahashi, Y.-H., Hu, D., Jackson, J., Seidel, C., Pugh, B.F., Shilatifard, A., 2012. Codependency of H2B monoubiquitination and nucleosome reassembly on Chd1. *Genes Dev.* 26, 914–919. doi:10.1101/gad.186841.112
- Lee, S.K., Fletcher, A.G.L., Zhang, L., Chen, X., Fischbeck, J.A., Stargell, L.A., 2010. Activation of a Poised RNAPII-Dependent Promoter Requires Both SAGA and Mediator. *Genetics* 184.
- Lenstra, T.L., Benschop, J.J., Kim, T., Schulze, J.M., Brabers, N.A.C.H., Margaritis, T., van de Pasch, L.A.L., van Heesch, S.A.A.C., Brok, M.O., Groot Koerkamp, M.J.A., Ko, C.W., van Leenen, D., Sameith, K., van Hooff, S.R., Lijnzaad, P., Kemmeren, P., Hentrich, T., Kobor, M.S., Buratowski, S., Holstege, F.C.P., 2011. The Specificity and Topology of Chromatin Interaction Pathways in Yeast. *Mol. Cell* 42, 536–549. doi:10.1016/j.molcel.2011.03.026
- Lenstra, T.L., Coulon, A., Chow, C.C., Larson, D.R., Lenstra, T.L., Coulon, A., Chow, C.C., Larson, D.R., 2015. Single-Molecule Imaging Reveals a Switch between Spurious and Functional ncRNA Transcription Article Single-Molecule Imaging Reveals a Switch between Spurious and Functional ncRNA Transcription. *Mol. Cell* 60, 597–610. doi:10.1016/j.molcel.2015.09.028
- Li, B., Carey, M., Workman, J.L., 2007a. The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* 128, 707–719. doi:10.1016/j.cell.2007.01.015
- Li, B., Gogol, M., Carey, M., Pattenden, S.G., Seidel, C., Workman, J.L., 2007b. Infrequently transcribed long genes depend on the Set2/Rpd3S pathway for accurate transcription. *Genes Dev.* 21, 1422–30. doi:10.1101/gad.1539307
- Li, B., Howe, L., Anderson, S., Yates, J.R., Workman, J.L., 2003. The Set2 histone methyltransferase functions through the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 278, 8897–903. doi:10.1074/jbc.M212134200
- Li, B., Weber, J.A., Chen, Y., Greenleaf, A.L., Gilmour, D.S., 1996. Analyses of promoter-proximal pausing by RNA polymerase II on the hsp70 heat shock gene promoter in a *Drosophila* nuclear extract. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5433–43.
- Li, G., Reinberg, D., 2011. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr. Opin.*

Genet. Dev. 21, 175–186. doi:10.1016/j.gde.2011.01.022

Li, Q., Zhou, H., Wurtele, H., Davies, B., Horazdovsky, B., Verreault, A., Zhang, Z., 2008. Acetylation of histone H3 lysine 56 regulates replication-coupled nucleosome assembly. *Cell* 134, 244–55. doi:10.1016/j.cell.2008.06.018

Li, X., Gerber, S.A., Rudner, A.D., Beausoleil, S.A., Haas, W., Villén, J., Elias, J.E., Gygi, S.P., 2007. Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.* 6, 1190–7. doi:10.1021/pr060559j

Li, Y., Keller, D.M., Scott, J.D., Lu, H., 2005. CK2 phosphorylates SSRP1 and inhibits its DNA-binding activity. *J. Biol. Chem.* 280, 11869–11875. doi:10.1074/jbc.M413944200

Lin, C.-H., Workman, J.L., 2011. Suppression of cryptic intragenic transcripts is required for embryonic stem cell self-renewal. *EMBO J.* 30, 1420–1421. doi:10.1038/emboj.2011.99

Lin, J.J., Lehmann, L.W., Bonora, G., Sridharan, R., Vashisht, A.A., Tran, N., Plath, K., Wohlschlegel, J.A., Carey, M., 2011. Mediator coordinates PIC assembly with recruitment of CHD1. *Genes Dev.* 25, 2198–209. doi:10.1101/gad.17554711

Lindstrom, D.L., Squazzo, S.L., Muster, N., Burckin, T.A., Wachter, C., Emigh, C.A., McCleery, J.A., Iii, J.R.Y., Hartzog, G.A., Wachter, K.C., 2003. Dual Roles for Spt5 in Pre-mRNA Processing and Transcription Elongation Revealed by Identification of Spt5-Associated Proteins. *Mol. Cell Biol.* 23, 1368–1378. doi:10.1128/MCB.23.4.1368

Lo, W.S., Trievel, R.C., Rojas, J.R., Duggan, L., Hsu, J.Y., Allis, C.D., Marmorstein, R., Berger, S.L., 2000. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol. Cell* 5, 917–926. doi:10.1016/S1097-2765(00)80257-9

Lorch, Y., LaPointe, J.W., Kornberg, R.D., 1987. Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 49, 203–10.

Lou, D.Y., Dominguez, I., Toselli, P., Landesman-Bollag, E., O'Brien, C., Seldin, D.C., 2008. The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development. *Mol. Cell Biol.* 28, 131–9. doi:10.1128/MCB.01119-07

Luger, K., Mäder, a W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260. doi:10.1038/38444

Maeshima, K., Imai, R., Tamura, S., Nozaki, T., 2014. Chromatin as dynamic 10-nm fibers. *Chromosoma* 123, 225–237. doi:10.1007/s00412-014-0460-2

Mariño-Ramírez, L., Bodenreider, O., Kantz, N., Jordan, I.K., 2006. Co-evolutionary rates of functionally related yeast genes. *Evol. Bioinform. Online* 2, 271–6.

Martens, C., Krett, B., Laybourn, P.J., 2001. RNA polymerase II and TBP occupy the repressed CYC1 promoter. *Mol. Microbiol.* 40, 1009–1019. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02445.x

Martens, J.A., Wu, P.Y.J., Winston, F., 2005. Regulation of an intergenic transcript controls adjacent gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 19, 2695–2704. doi:10.1101/gad.1367605

- Mas, G., de Nadal, E., Dechant, R., Rodríguez de la Concepción, M.L., Logie, C., Jimeno-González, S., Chávez, S., Ammerer, G., Posas, F., 2009. Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *EMBO J.* 28, 326–36. doi:10.1038/emboj.2008.299
- Mavrich, T.N., Ioshikhes, I.P., Venters, B.J., Jiang, C., Tomsho, L.P., Qi, J., Schuster, S.C., Albert, I., Pugh, B.F., 2008a. A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosome throughout the yeast genome. *Genome Res.* 18, 1073–1083. doi:10.1101/gr.078261.108.1
- Mavrich, T.N., Jiang, C., Ioshikhes, I.P., Li, X., Venters, B.J., Zanton, S.J., Tomsho, L.P., Qi, J., Glaser, R.L., Schuster, S.C., Gilmour, D.S., Albert, I., Pugh, B.F., 2008b. Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature* 453, 358–362. doi:10.1038/nature06929
- Mayer, A., Lidschreiber, M., Siebert, M., Leike, K., Söding, J., Cramer, P., 2010. Uniform transitions of the general RNA polymerase II transcription complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1272–1278. doi:10.1038/nsmb.1903
- Mayer, A., Schrieck, A., Lidschreiber, M., Leike, K., Martin, D.E., Cramer, P., 2012. The spt5 C-terminal region recruits yeast 3' RNA cleavage factor I. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1321–31. doi:10.1128/MCB.06310-11
- McCullough, L., Connell, Z., Petersen, C., Formosa, T., 2015. The abundant histone chaperones Spt6 and FACT collaborate to assemble, inspect, and maintain chromatin structure in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 201, 1030–1045. doi:10.1534/genetics.115.180794
- McDonald, S.M., Close, D., Xin, H., Formosa, T., Hill, C.P., 2010. Structure and Biological Importance of the Spn1-Spt6 Interaction, and Its Regulatory Role in Nucleosome Binding. *Mol. Cell* 40, 725–735. doi:10.1016/j.molcel.2010.11.014
- McKinley, K.L., Cheeseman, I.M., 2016. The molecular basis for centromere identity and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 16–29. doi:10.1038/nrm.2015.5
- Meggio, F., Pinna, L. a, 2003. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* 17, 349–368. doi:10.1096/fj.02-0473rev
- Miller, T., Krogan, N.J., Dover, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Johnston, M., Greenblatt, J.F., Shilatifard, A., 2001. COMPASS: a complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12902–7. doi:10.1073/pnas.231473398
- Milligan, L., Huynh-Thu, V.A., Delan-Forino, C., Tuck, A., Petfalski, E., Lombraña, R., Sanguinetti, G., Kudla, G., Tollervy, D., 2016. Strand-specific, high-resolution mapping of modified RNA polymerase II. *Mol. Syst. Biol.* 12, 874.
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.-H., Sen, S., Wu, C., 2004. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303, 343–8. doi:10.1126/science.1090701
- Mohrmann, L., Verrijzer, C.P., 2005. Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1681, 59–73. doi:10.1016/j.bbaexp.2004.10.005
- Muse, G.W., Gilchrist, D.A., Nechaev, S., Shah, R., Parker, J.S., Grissom, S.F., Zeitlinger, J.,

- Adelman, K., 2007. RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat. Genet.* 39, 1507–1511. doi:10.1038/ng.2007.21
- Musselman, C.A., Lalonde, M.-E., Côté, J., Kutateladze, T.G., 2012. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1218–1227. doi:10.1038/nsmb.2436
- Narlikar, G.J., Sundaramoorthy, R., Owen-Hughes, T., 2013. Mechanisms and Functions of ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Enzymes. *Cell* 154, 490–503. doi:10.1016/j.cell.2013.07.011
- Nechaev, S., Adelman, K., 2011. Pol II waiting in the starting gates: Regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1809, 34–45. doi:10.1016/j.bbagr.2010.11.001
- Neigeborn, L., Celenza, J.L., Carlson, M., 1987. SSN20 is an essential gene with mutant alleles that suppress defects in SUC2 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 672–8. doi:10.1128/MCB.7.2.672.Updated
- Neigeborn, L., Rubin, K., Carlson, M., 1986. Suppressors of *snf2* mutations restores invertase derepression and cause temperature-sensitive lethality in yeast. *Genetics* 112(4):741-53.
- Neil, H., Malabat, C., D'Aubenton-Carafa, Y., Xu, Z., Steinmetz, L.M., Jacquier, A., 2009. Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature* 457, 1038–42. doi:10.1038/nature07747
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., 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, 709–19.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., Struhl, K., 2002. Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev.* 16, 806–19. doi:10.1101/gad.978902
- Nishino, Y., Eltsov, M., Joti, Y., Ito, K., Takata, H., Takahashi, Y., Hihara, S., Frangakis, A.S., Imamoto, N., Ishikawa, T., Maeshima, K., 2012. Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J.* 31, 1644–53. doi:10.1038/emboj.2012.35
- Nourani, A., Robert, F., Winston, F., 2006. Evidence that Spt2/Sin1, an HMG-like factor, plays roles in transcription elongation, chromatin structure, and genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1496–509. doi:10.1128/MCB.26.4.1496-1509.2006
- Olsten, M.E.K., Litchfield, D.W., 2004. Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2. *Biochem. cell Biol.* 82, 681–93. doi:10.1139/o04-116
- Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C.H., Luse, D.S., Reinberg, D., 1998. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* 92, 105–116. doi:10.1016/S0092-8674(00)80903-4
- Orphanides, G., Wu, W.H., Lane, W.S., Hampsey, M., Reinberg, D., 1999. The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature* 400, 284–8. doi:10.1038/22350

- Osakabe, A., Tachiwana, H., Takaku, M., Hori, T., Obuse, C., Kimura, H., Fukagawa, T., Kurumizaka, H., 2013. Vertebrate Spt2 is a novel nucleolar histone chaperone that assists in ribosomal DNA transcription. *J. Cell Sci.* 126, 1323–32. doi:10.1242/jcs.112623
- Padmanabha, R., Chen-Wu, J.L., Hanna, D.E., Glover, C. V, 1990. Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4089–4099. doi:10.1128/MCB.10.8.4089.Updated
- Palancade, B., Dubois, M., Bensaude, O., 2002. FCP1 Phosphorylation by Casein Kinase 2 Enhances Binding to TFIIF and RNA Polymerase II Carboxyl-terminal Domain FCP1 Phosphorylation by Casein Kinase 2 Enhances Binding to TFIIF and RNA Polymerase II Carboxyl-terminal D. *J. Biol. Chem.* 277, 36061–67. doi:10.174/jbc.M205192200
- Parnell, T.J., Schlichter, A., Wilson, B.G., Cairns, B.R., Snyder, M., Kadonaga, J., Liu, X., Struhl, K., Huber, W., Steinmetz, L., Andrews, B., Tyers, M., Boone, C., Mnaimneh, S., Terterov, D., Coburn, D., Yeo, A.L., Yeo, Z., Clarke, N., Lieb, J., Ansari, A., Nislow, C., Hughes, T., 2015. The chromatin remodelers RSC and ISW1 display functional and chromatin-based promoter antagonism. *Elife* 4, e06073. doi:10.7554/eLife.06073
- Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A., Reinberg, D., 2006. Histone H2B Monoubiquitination Functions Cooperatively with FACT to Regulate Elongation by RNA Polymerase II. *Cell* 125, 703–717. doi:10.1016/j.cell.2006.04.029
- Pérez-Martín, J., Johnson, A.D., 1998. Mutations in chromatin components suppress a defect of Gcn5 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1049–54.
- Peterson, C.L., Kruger, W., Herskowitz, I., 1991. A functional interaction between the C-terminal domain of RNA polymerase II and the negative regulator SIN1. *Cell* 64, 1135–1143. doi:0092-8674(91)90268-4 [pii]
- Pickart, C.M., 2001. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol. Cell* 8, 499–504.
- Pointner, J., Persson, J., Prasad, P., Norman-Axelsson, U., Strålfors, A., Khorosjutina, O., Krietenstein, N., Svensson, J.P., Ekwall, K., Korber, P., 2012. CHD1 remodelers regulate nucleosome spacing in vitro and align nucleosomal arrays over gene coding regions in *S. pombe*. *EMBO J.* 31, 4388–403. doi:10.1038/emboj.2012.289
- Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D.K., Young, R.A., 2005. Genome-wide Map of Nucleosome Acetylation and Methylation in Yeast. *Cell* 122, 517–527. doi:10.1016/j.cell.2005.06.026
- Pollard, K.J., Peterson, C.L., 1997. Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6212–6222.
- Prather, D., Krogan, N.J., Emili, A., Greenblatt, J.F., Winston, F., 2005. Identification and characterization of Elf1, a conserved transcription elongation factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10122–35. doi:10.1128/MCB.25.22.10122-10135.2005
- Pujari, V., Radebaugh, C.A., Chodaparambil, J. V., Muthurajan, U.M., Almeida, A.R., Fischbeck, J.A., Luger, K., Stargell, L.A., 2010. The transcription factor Spn1 regulates gene expression via a highly conserved novel structural motif. *J. Mol. Biol.* 404, 1–15. doi:10.1016/j.jmb.2010.09.040

- Qiu, H., Chereji, R. V., Hu, C., Cole, H.A., Rawal, Y., Clark, D.J., Hinnebusch, A.G., 2016. Genome-wide cooperation by HAT Gcn5, remodeler SWI/SNF, and chaperone Ydj1 in promoter nucleosome eviction and transcriptional activation. *Genome Res.* 26, 211–225. doi:10.1101/gr.196337.115
- Radman-Livaja, M., Quan, T.K., Valenzuela, L., Armstrong, J.A., van Welsem, T., Kim, T., Lee, L.J., Buratowski, S., van Leeuwen, F., Rando, O.J., Hartzog, G.A., 2012. A Key Role for Chd1 in Histone H3 Dynamics at the 3' Ends of Long Genes in Yeast. *PLoS Genet.* 8, e1002811. doi:10.1371/journal.pgen.1002811
- Radman-Livaja, M., Rando, O.J., 2010. Nucleosome positioning: How is it established, and why does it matter? *Dev. Biol.* 339, 258–266. doi:10.1016/j.ydbio.2009.06.012
- Radonjic, M., Andrau, J.-C., Lijnzaad, P., Kemmeren, P., Kockelkorn, T.T.J.P., van Leenen, D., van Berkum, N.L., Holstege, F.C.P., 2005. Genome-Wide Analyses Reveal RNA Polymerase II Located Upstream of Genes Poised for Rapid Response upon *S. cerevisiae* Stationary Phase Exit. *Mol. Cell* 18, 171–183. doi:10.1016/j.molcel.2005.03.010
- Ramanathan, B., Smerdon, M.J., 1989. Enhanced DNA repair synthesis in hyperacetylated nucleosomes. *J. Biol. Chem.* 264, 11026–11034.
- Rando, O.J., Winston, F., 2012. Chromatin and Transcription in Yeast. *Genetics* 190.
- Ray-Gallet, D., Woolfe, A., Vassias, I., Pellentz, C., Lacoste, N., Puri, A., Schultz, D.C., Pchelintsev, N.A., Adams, P.D., Jansen, L.E.T., Almouzni, G., 2011. Dynamics of Histone H3 Deposition In Vivo Reveal a Nucleosome Gap-Filling Mechanism for H3.3 to Maintain Chromatin Integrity. *Mol. Cell* 44, 928–941. doi:10.1016/j.molcel.2011.12.006
- Reese, J.C., 2003. Basal transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 114–118. doi:10.1016/S0959-437X(03)00013-3
- Ricci, M.A., Manzo, C., García-Parajo, M.F., Lakadamyali, M., Cosma, M.P., 2015. Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell* 160, 1145–58. doi:10.1016/j.cell.2015.01.054
- Rufiange, A., Jacques, P.É., Bhat, W., Robert, F., 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. doi:10.1016/j.molcel.2007.07.011
- Saez-Vasquez, J., Meissner, M., Pikaard, C.S., 2001. RNA polymerase I holoenzyme - Promoter complexes include an associated CK2-like protein kinase. *Plant Mol. Biol.* 47, 449–459. doi:10.1023/A:1011619413393
- Sawa, C., Nedeá, E., Krogan, N., Wada, T., Handa, H., Greenblatt, J., Buratowski, S., 2004. Bromodomain Factor 1 (Bdf1) Is Phosphorylated by Protein Kinase CK2 Bromodomain Factor 1 (Bdf1) Is Phosphorylated by Protein Kinase CK2. *Society* 1, 4734–4742. doi:10.1128/MCB.24.11.4734
- Schmitt, A.M., Chang, H.Y., 2016. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell* 29, 452–463. doi:10.1016/j.ccell.2016.03.010
- Schones, D., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T., 2008. Dynamic regulation of nucleosome positioning

in the human genome. *Cell* 132, 887–898. doi:10.1016/j.cell.2008.02.022

Schüller, R., Forné, I., Straub, T., Schreieck, A., Texier, Y., Shah, N., Decker, T.-M., Cramer, P., Imhof, A., Eick, D., 2016. Heptad-Specific Phosphorylation of RNA Polymerase II CTD. *Mol. Cell* 61, 305–314. doi:10.1016/j.molcel.2015.12.003

Schwabish, M.A., Struhl, K., 2007. The Swi/Snf complex is important for histone eviction during transcriptional activation and RNA polymerase II elongation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6987–95. doi:10.1128/MCB.00717-07

Schwabish, M.A., Struhl, K., 2004. Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10111–7. doi:10.1128/MCB.24.23.10111-10117.2004

Sdano, M.A., Fulcher, J.M., Palani, S., Chandrasekharan, M.B., Parnell, T.J., Whitby, F.G., Formosa, T., Hill, C.P., 2017. A novel SH2 recognition mechanism recruits Spt6 to the doubly phosphorylated RNA polymerase II linker at sites of transcription. *Elife* 6, e28723. doi:10.7554/eLife.28723

Sekinger, E.A., Moqtaderi, Z., Struhl, K., 2005. Intrinsic Histone-DNA Interactions and Low Nucleosome Density Are Important for Preferential Accessibility of Promoter Regions in Yeast. *Mol. Cell* 18, 735–748. doi:10.1016/j.molcel.2005.05.003

Selth, L.A., Lorch, Y., Ocampo-Hafalla, M.T., Mitter, R., Shales, M., Krogan, N.J., Kornberg, R.D., Svejstrup, J.Q., 2009. An Rtt109-Independent Role for Vps75 in Transcription-Associated Nucleosome Dynamics. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4220–4234. doi:10.1128/MCB.01882-08

Selth, L.A., Sigurdsson, S., Svejstrup, J.Q., 2010. Transcript Elongation by RNA Polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 271–293. doi:10.1146/annurev.biochem.78.062807.091425

Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A., Wu, C., 2000. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 406, 541–544. doi:10.1038/35020123

Shetty, A., Kallgren, S.P., Demel, C., Maier, K.C., Spatt, D., Alver, B.H., Cramer, P., Park, P.J., Winston, F., 2017. Spt5 Plays Vital Roles in the Control of Sense and Antisense Transcription Elongation. *Mol. Cell* 66, 77–88.e5. doi:10.1016/j.molcel.2017.02.023

Shimajima, T., Okada, M., Nakayama, T., Ueda, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Handa, H., Hirose, S., 2003. Drosophila FACT contributes to Hox gene expression through physical and functional interactions with GAGA factor. *Genes Dev.* 17, 1605–1616. doi:10.1101/gad.1086803

Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M.J., Davie, J.R., Peterson, C.L., 2006. Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions. *Science* (80-.). 311.

Shu, H., Nakamura, M., Siretskiy, A., Borghi, L., Moraes, I., Wildhaber, T., Gruissem, W., Hennig, L., 2014. Arabidopsis replacement histone variant H3.3 occupies promoters of regulated genes. *Genome Biol.* 15, R62. doi:10.1186/gb-2014-15-4-r62

Sikorski, T.W., Buratowski, S., 2009. The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 344–351. doi:10.1016/j.ceb.2009.03.006

Simic, R., Lindstrom, D.L., Tran, H.G., Roinick, K.L., Costa, P.J., Johnson, A.D., Hartzog, G.A.,

- Arndt, K.M., 2003. Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *EMBO J.* 22, 1846–56. doi:10.1093/emboj/cdg179
- Skene, P.J., Hernandez, A.E., Groudine, M., Henikoff, S., 2014. The nucleosomal barrier to promoter escape by RNA polymerase II is overcome by the chromatin remodeler Chd1. *Elife* 3, e02042. doi:10.7554/eLife.02042
- Smolle, M., Venkatesh, S., Gogol, M.M., Li, H., Zhang, Y., Florens, L., Washburn, M.P., Workman, J.L., 2012. Chromatin remodelers Isw1 and Chd1 maintain chromatin structure during transcription by preventing histone exchange. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 884–892. doi:10.1038/nsmb.2312
- Soutourina, J., Bordas-Le Floch, V., Gendrel, G., Flores, A., Ducrot, C., Dumay-Odelot, H., Soularue, P., Navarro, F., Cairns, B.R., Lefebvre, O., Werner, M., 2006. Rsc4 Connects the Chromatin Remodeler RSC to RNA Polymerases. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4920–4933. doi:10.1128/MCB.00415-06
- Spain, M.M., Ansari, S.A., Pathak, R., Palumbo, M.J., Morse, R.H., Govind, C.K., 2014. The RSC Complex Localizes to Coding Sequences to Regulate Pol II and Histone Occupancy. *Mol. Cell* 56, 653–666. doi:10.1016/j.molcel.2014.10.002
- St-Denis, N.A., Litchfield, D.W., 2009. From birth to death: The role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1817–1829. doi:10.1007/s00018-009-9150-2
- Steiner, F.A., Henikoff, S., 2015. Diversity in the organization of centromeric chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 31, 28–35. doi:10.1016/j.gde.2015.03.010
- Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45. doi:10.1038/47412
- Strohner, R., Wachsmuth, M., Dachauer, K., Mazurkiewicz, J., Hochstatter, J., Rippe, K., Längst, G., 2005. A “loop recapture” mechanism for ACF-dependent nucleosome remodeling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 683–690. doi:10.1038/nsmb966
- Studitsky, V.M., Walter, W., Kireeva, M., Kashlev, M., Felsenfeld, G., 2004. Chromatin remodeling by RNA polymerases. *Trends Biochem. Sci.* 29, 127–35. doi:10.1016/j.tibs.2004.01.003
- Sudarsanam, P., Iyer, V.R., Brown, P.O., Winston, F., 2000. Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3364–3369. doi:10.1073/pnas.050407197
- Szenker, E., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., 2011. The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res* 21, 421–434. doi:10.1038/cr.2011.14
- Takahata, S., Yu, Y., Stillman, D.J., 2009. FACT and Asf1 Regulate Nucleosome Dynamics and Coactivator Binding at the HO Promoter. *Mol. Cell* 34, 405–415. doi:10.1016/j.molcel.2009.04.010
- Talbert, P.B., Henikoff, S., 2017. Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 115–126. doi:10.1038/nrm.2016.148
- Tang, L., Nogales, E., Ciferri, C., 2010. Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling

complexes and mechanistic implications for transcription. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 102, 122–128. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2010.05.001

Tessarz, P., Kouzarides, T., 2014. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 703–708. doi:10.1038/nrm3890

Thebault, P., Boutin, G., Bhat, W., Rufiange, A., Martens, J., Nourani, A., 2011. Transcription regulation by the noncoding RNA SRG1 requires Spt2-dependent chromatin deposition in the wake of RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1288–1300. doi:10.1128/MCB.01083-10

Tirosh, I., Barkai, N., 2008. Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes. *Genome Res.* 18, 1084–1091. doi:10.1101/gr.076059.108

Tomson, B.N., Arndt, K.M., 2013. The many roles of the conserved eukaryotic Paf1 complex in regulating transcription, histone modifications, and disease states. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1829, 116–126. doi:10.1016/j.bbagr.2012.08.011

Tran, H.G., Steger, D.J., Iyer, V.R., Johnson, A.D., 2000. The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *EMBO J.* 19, 2323–31. doi:10.1093/emboj/19.10.2323

Trembley, J.H., Wang, G., Unger, G., Slaton, J., Ahmed, K., 2009. CK2: A key player in cancer biology. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1858–1867. doi:10.1007/s00018-009-9154-y

Unnikrishnan, A., Gafken, P.R., Tsukiyama, T., 2010. Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 430–437. doi:10.1038/nsmb.1780

Uwimana, N., Collin, P., Jeronimo, C., Haibe-Kains, B., Robert, F., 2017. Bidirectional terminators in *Saccharomyces cerevisiae* prevent cryptic transcription from invading neighboring genes. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkx242

Valieva, M.E., Armeev, G.A., Kudryashova, K.S., Gerasimova, N.S., Shaytan, A.K., Kulaeva, O.I., McCullough, L.L., Formosa, T., Georgiev, P.G., Kirpichnikov, M.P., Studitsky, V.M., Feofanov, A. V., 2016. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 1111–1116. doi:10.1038/nsmb.3321

Valouev, A., Johnson, S.M., Boyd, S.D., Smith, C.L., Fire, A.Z., Sidow, A., 2011. Determinants of nucleosome organization in primary human cells. *Nature* 474, 516–520. doi:10.1038/nature10002

van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., Gasser, S.M., 2004. Recruitment of the INO80 Complex by H2A Phosphorylation Links ATP-Dependent Chromatin Remodeling with DNA Double-Strand Break Repair. *Cell* 119, 777–788. doi:10.1016/j.cell.2004.11.033

van Bakel, H., Tsui, K., Gebbia, M., Mnaimneh, S., Hughes, T.R., Nislow, C., 2013. A Compendium of Nucleosome and Transcript Profiles Reveals Determinants of Chromatin Architecture and Transcription. *PLoS Genet.* 9, e1003479. doi:10.1371/journal.pgen.1003479

van Dijk, E.L., Chen, C.L., D'Aubenton-Carafa, Y., Gourvenec, S., Kwapisz, M., Roche, V., Bertrand, C., Silvain, M., Legoix-Né, P., Loeillet, S., Nicolas, A., Thermes, C., Morillon, A., 2011. XUTs are a class of Xrn1-sensitive antisense regulatory non-coding RNA in yeast. *Nature* 475, 114–7. doi:10.1038/nature10118

- Varshavsky, A., 2005. Regulated protein degradation. *Trends Biochem. Sci.* 30, 283–286. doi:10.1016/j.tibs.2005.04.005
- Venkatesh, S., Li, H., Gogol, M.M., Workman, J.L., Workman, J.L., 2016. Selective suppression of antisense transcription by Set2-mediated H3K36 methylation. *Nat. Commun.* 7, 13610. doi:10.1038/ncomms13610
- Venkatesh, S., Smolle, M., Li, H., Gogol, M.M., Saint, M., Kumar, S., Natarajan, K., Workman, J.L., 2012. Set2 methylation of histone H3 lysine 36 suppresses histone exchange on transcribed genes. *Nature* 489, 452–455. doi:10.1038/nature11326
- Venkatesh, S., Workman, J.L., 2015. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 178–189. doi:10.1038/nrm3941
- Venters, B.J., Pugh, B.F., 2009. A canonical promoter organization of the transcription machinery and its regulators in the *Saccharomyces* genome. *Genome Res.* 19, 360–71. doi:10.1101/gr.084970.108
- Verzijlbergen, K.F., Menendez-Benito, V., van Welsem, T., van Deventer, S.J., Lindstrom, D.L., Ovaa, H., Neefjes, J., Gottschling, D.E., van Leeuwen, F., 2010. Recombination-induced tag exchange to track old and new proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 64–68. doi:10.1073/pnas.0911164107
- Vilk, G., Weber, J.E., Turowec, J.P., Duncan, J.S., Wu, C., Derksen, D.R., Zien, P., Sarno, S., Donella-Deana, A., Lajoie, G., Pinna, L.A., Li, S.S.C., Litchfield, D.W., 2008. Protein kinase CK2 catalyzes tyrosine phosphorylation in mammalian cells. *Cell. Signal.* 20, 1942–1951. doi:10.1016/j.cellsig.2008.07.002
- Waddington, C.H., 1942. The epigenotype. 1942. *Int. J. Epidemiol.* 41, 10–13. doi:10.1093/ije/dyr184
- Wang, A., Kurdistani, S.K., Grunstein, M., 2002. Requirement of Hos2 Histone Deacetylase for Gene Activity in Yeast. *Science* (80-.). 298, 1412–1414. doi:10.1126/science.1077790
- Weake, V.M., Workman, J.L., 2008. Histone Ubiquitination: Triggering Gene Activity. *Mol. Cell* 29, 653–663. doi:10.1016/j.molcel.2008.02.014
- Weiner, A., Chen, H. V., Liu, C.L., Rahat, A., Klien, A., Soares, L., Gudipati, M., Pfeffner, J., Regev, A., Buratowski, S., Pleiss, J.A., Friedman, N., Rando, O.J., 2012. Systematic Dissection of Roles for Chromatin Regulators in a Yeast Stress Response. *PLoS Biol.* 10, e1001369. doi:10.1371/journal.pbio.1001369
- Wery, M., Shematorova, E., Van Driessche, B., Vandenhoute, J., Thuriaux, P., Van Mullem, V., 2004. Members of the SAGA and Mediator complexes are partners of the transcription elongation factor TFIIS. *EMBO J.* 23, 4232–4242. doi:10.1038/sj.emboj.7600326
- Whitehouse, I., Rando, O.J., Delrow, J., Tsukiyama, T., 2007. Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription. *Nature* 450, 1031–1035. doi:10.1038/nature06391
- Wilhelm, F.X., Wilhelm, M.L., Erard, M., Duane, M.P., 1978. Reconstitution of chromatin: assembly of the nucleosome. *Nucleic Acids Res.* 5, 505–521.

- Williams, S.K., Truong, D., Tyler, J.K., 2008. Acetylation in the globular core of histone H3 on lysine-56 promotes chromatin disassembly during transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 9000–9005. doi:10.1073/pnas.0800057105
- Wilusz, J.E., Sunwoo, H., Spector, D.L., 2009. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev.* 23, 1494–504. doi:10.1101/gad.1800909
- Winston, F., Chaleff, D.T., Valent, B., Fink, G.R., 1984. Mutations affecting Ty-mediated expression of the HIS4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 107, 179–197.
- Wood, A., Krogan, N.J., Dover, J., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M.A., Dean, K., Golshani, A., Zhang, Y., Greenblatt, J.F., Johnston, M., Shilatifard, A., 2003. Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol. Cell* 11, 267–74.
- Woodcock, C.L., Dimitrov, S., 2001. Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 130–135. doi:10.1016/S0959-437X(00)00169-6
- Workman, J.L., Kingston, R.E., 1998. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 545–579. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.545
- Wu, L., Winston, F., 1997. Evidence that Snf-Swi controls chromatin structure over both the TATA and UAS regions of the SUC2 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 25, 4230–4.
- Wu, S.Y., Lee, A.Y., Lai, H.T., Zhang, H., Chiang, C.M., 2013. Phospho switch triggers brd4 chromatin binding and activator recruitment for gene-specific targeting. *Mol. Cell* 49, 843–857. doi:10.1016/j.molcel.2012.12.006
- Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J.C., Dufour, M.E., Boulay, J., Régnault, B., Devaux, F., Namane, A., Séraphin, B., Libri, D., Jacquier, A., 2005. Cryptic Pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell* 121, 725–737. doi:10.1016/j.cell.2005.04.030
- Xie, L., Pelz, C., Wang, W., Bashar, A., Varlamova, O., Shadle, S., Impey, S., 2011. KDM5B regulates embryonic stem cell self-renewal and represses cryptic intragenic transcription. *EMBO J.* 30, 1473–84. doi:10.1038/emboj.2011.91
- Xu, M., Long, C., Chen, X., Huang, C., Chen, S., Zhu, B., 2010. Partitioning of Histone H3-H4 Tetramers During DNA Replication-Dependent Chromatin Assembly. *Science* (80-.). 328, 94–98. doi:10.1126/science.1178994
- Xu, Y., Price, B.D., 2011. Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle* 10, 261–267. doi:10.4161/cc.10.2.14543
- Yadon, A.N., Van de Mark, D., Basom, R., Delrow, J., Whitehouse, I., Tsukiyama, T., 2010. Chromatin Remodeling around Nucleosome-Free Regions Leads to Repression of Noncoding RNA Transcription. *Mol. Cell. Biol.* 30, 5110–5122. doi:10.1128/MCB.00602-10
- Yamaguchi, Y., Narita, T., Inukai, N., Wada, T., Handa, H., 2001. SPT genes: key players in the regulation of transcription, chromatin structure and other cellular processes. *J. Biochem.* 129, 185–191.

- Yang, J., Zhang, X., Feng, J., Leng, H., Li, S., Xiao, J., Liu, S., Xu, Z., Xu, J., Li, D., Wang, Z., Wang, J., Li, Q., 2016. The Histone Chaperone FACT Contributes to DNA Replication-Coupled Nucleosome Assembly. *Cell Rep.* 14, 1128–1141. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.096
- Yen, K., Vinayachandran, V., Batta, K., Koerber, R.T., Pugh, B.F., 2012. Genome-wide Nucleosome Specificity and Directionality of Chromatin Remodelers. *Cell* 149, 1461–1473. doi:10.1016/j.cell.2012.04.036
- Yoh, S.M., Cho, H., Pickle, L., Evans, R.M., Jones, K.A., 2007. The Spt6 SH2 domain binds Ser2-P RNAPII to direct Iws1-dependent mRNA splicing and export. *Genes Dev.* 21, 160–174. doi:10.1101/gad.1503107
- Yoh, S.M., Lucas, J.S., Jones, K. a, 2008. The Iws1 : Spt6 : CTD complex controls cotranscriptional mRNA The Iws1 : Spt6 : CTD complex controls cotranscriptional mRNA biosynthesis and HYPB / Setd2-mediated histone H3K36 methylation. *Genes Dev.* 3422–3434. doi:10.1101/gad.1720008
- Yoon, S., Qiu, H., Swanson, M.J., Hinnebusch, A.G., 2003. Recruitment of SWI/SNF by Gcn4p does not require Snf2p or Gcn5p but depends strongly on SWI/SNF integrity, SRB mediator, and SAGA. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8829–45.
- Youdell, M.L., Kizer, K.O., Kisseleva-Romanova, E., Fuchs, S.M., Duro, E., Strahl, B.D., Mellor, J., 2008. Roles for Ctk1 and Spt6 in regulating the different methylation states of histone H3 lysine 36. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4915–26. doi:10.1128/MCB.00001-08
- Yun, M., Wu, J., Workman, J.L., Li, B., 2011. Readers of histone modifications. *Cell Res.* 21, 564–78. doi:10.1038/cr.2011.42
- Zanton, S.J., Pugh, B.F., 2006. Full and partial genome-wide assembly and disassembly of the yeast transcription machinery in response to heat shock. *Genes Dev.* 20, 2250–65. doi:10.1101/gad.1437506
- Zentner, G.E., Tsukiyama, T., Henikoff, S., 2013. ISWI and CHD chromatin remodelers bind promoters but act in gene bodies. *PLoS Genet.* 9, e1003317. doi:10.1371/journal.pgen.1003317
- Zhang, H., Roberts, D.N., 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, 219–31. doi:10.1016/j.cell.2005.08.036
- Zhang, L., Fletcher, A.G.L., Cheung, V., Winston, F., Stargell, L.A., 2008. Spn1 regulates the recruitment of Spt6 and the Swi/Snf complex during transcriptional activation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1393–403. doi:10.1128/MCB.01733-07
- Zhang, W., Li, Y., Kulik, M., Tiedemann, R.L., Robertson, K.D., Dalton, S., Zhao, S., 2016. Nucleosome positioning changes during human embryonic stem cell differentiation. *Epigenetics* 11, 426–437. doi:10.1080/15592294.2016.1176649
- Zhang, Z., Wippo, C.J., Wal, M., Ward, E., Korber, P., Pugh, B.F., 2011. A Packing Mechanism for Nucleosome Organization Reconstituted Across a Eukaryotic Genome. *Science* (80-.). 332, 977–980. doi:10.1126/science.1200508
- Zhou, C.Y., Johnson, S.L., Gamarra, N.I., Narlikar, G.J., 2016. Mechanisms of ATP-Dependent Chromatin Remodeling Motors. *Annu. Rev. Biophys.* 45, 153–181. doi:10.1146/annurev-biophys-

051013-022819

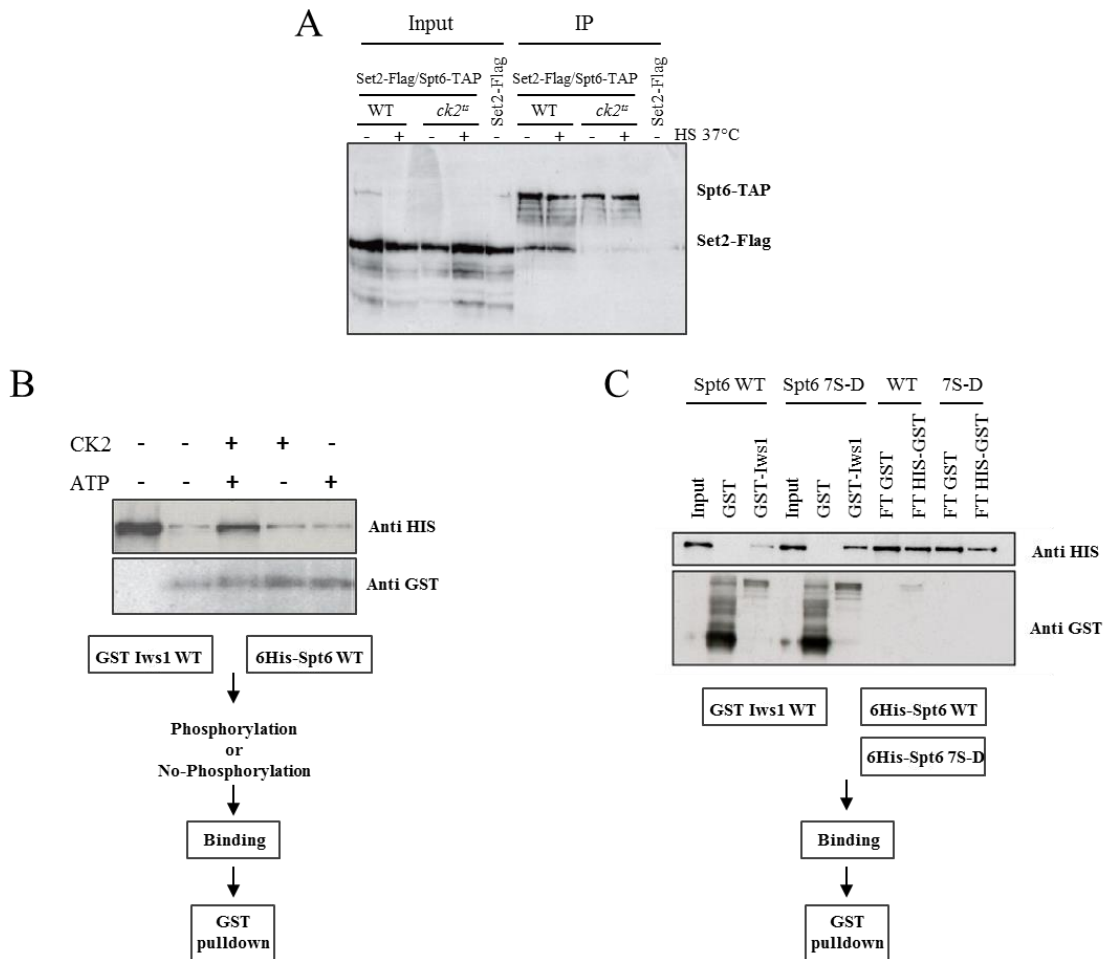
Zhou, W., Zhu, P., Wang, J., Pascual, G., Ohgi, K.A., Lozach, J., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2008. Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Mol. Cell* 29, 69–80. doi:10.1016/j.molcel.2007.11.002

Zlatanova, J., Thakar, A., 2008. H2A.Z: View from the Top. *Structure* 16, 166–179. doi:10.1016/j.str.2007.12.008

Zobeck, K.L., Buckley, M.S., Zipfel, W.R., Lis, J.T., 2010. Recruitment Timing and Dynamics of Transcription Factors at the Hsp70 Loci in Living Cells. *Mol. Cell* 40, 965–975. doi:10.1016/j.molcel.2010.11.022

Zofall, M., Persinger, J., Kassabov, S.R., Bartholomew, B., 2006. Chromatin remodeling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 339–346. doi:10.1038/nsmb1071

Annexe



A- Spt6 et Set2 interagissent de façon CK2-dépendante. Des souches WT et *ck2^{ts}* qui expriment Spt6-TAP et Set-Flag sont cultivées à 30°C et subissent ou non un choc thermique de 2h à 37°C. A partir d'extraits protéiques totaux, Spt6-TAP est immunoprécipitée avec des billes IgG. Les échantillons précipités sont analysés par immunobuvardage avec un anticorps dirigé contre l'épitope Flag. Une souche exprimant uniquement Set2-FLAG est utilisée comme contrôle. **B-** La phosphorylation de Spt6 par CK2 stimule l'interaction Spt6-Iws1 *in vitro*. GST pulldown réalisé avec les protéines recombinantes GST-Iws1 et 6xHis-Spt6. GST seul est utilisé comme contrôle. Les protéines sont phosphorylées *in vitro* par CK2 ou non, préalablement au pulldown. Les protéines sont incubées en quantité égale, purifiées, séparées sur gel SDS-PAGE analysées par immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre les étiquettes HIS et GST. **C-** Expérience de GST pulldown avec les protéines recombinantes GST-Iws1 et 6xHis-Spt6 (WT ou 7S-D phosphomimétique). GST seul est utilisé comme contrôle. Les protéines sont incubées en quantité égale, purifiées et séparées sur gel SDS-PAGE. Les niveaux respectifs de 6xHis-Spt6 et GST-Iws1 sont analysés par immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre les étiquettes HIS et GST.