



HAL
open science

Rôle de Hda1 dans la régulation de l'expression gènes par les longs ARN

Mathieu Tisseur

► **To cite this version:**

Mathieu Tisseur. Rôle de Hda1 dans la régulation de l'expression gènes par les longs ARN. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112100 . tel-01165958

HAL Id: tel-01165958

<https://theses.hal.science/tel-01165958>

Submitted on 21 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Ecole Doctorale « Gènes, Génomes, Cellules »

Spécialité

Biologie Moléculaire

Présentée par

Mathieu TISSEUR

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS XI

**« Rôle de Hda1 dans la régulation de
l'expression des gènes par les longs ARNnc »**

JURY

Françoise STUTZ

Valérie BORDE

Lionel BENARD

Daniel GAUTHERET

Antonin MORILLON

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Président

Directeur de thèse

Remerciements

Il y a tant de monde que je souhaite remercier que j'ai peur d'oublier des gens, d'autant que je n'ai pas une très bonne mémoire des noms. Je vais donc reprendre la chronologie de ma thèse afin de limiter les oublis.

J'ai tout d'abord débuté au Centre de Génétique Moléculaire à Gif-sur-Yvette. J'ai vraiment apprécié l'ambiance pendant les 7 mois que j'y ai passé, bonne ambiance portée par Delphine et Patricia. Nous seulement elles m'ont été d'un immense secours en préparant plus d'une fois des litres de milieu de culture à la dernière minute mais leur bonne humeur habituelle m'a beaucoup aidé à garder un bon moral. La Sainte-Catherine et le splendide chapeau vert et jaune, la pseudo-tradition du gâteau au chocolat à laquelle je me suis plié resteront toujours d'excellents souvenirs. Je tiens aussi à remercier tous les membres des différentes équipes présentes à notre étage avec qui j'ai pu échanger.

Puis le laboratoire à déménager dans un tout autre environnement puisque nous avons débarqué à l'institut Curie en mai 2010. J'y ai côtoyé avec plaisir les membres de l'équipe de Michelle Debatisse et notamment Anne, Anne-Marie, Sandra, Benoît, Hervé, Thérèse dont certains étaient embarqué dans la même aventure que moi. Je tiens aussi à remercier Luis, Aurélie, Iva, Vincent, Boris (qui n'est pas Mike), Mike (qui n'est pas Boris) dont l'impeccable accent anglais m'a toujours rendu jaloux. Je tiens tout particulièrement à remercier Marie-France pour m'avoir beaucoup fait rire avec ses blagues et son franc-parler. Et puis il y a aussi les gens du 5^{ème} étage que je croisais en allant en pièce « radioactivité », et parmi eux Pierre dit « blondin » avec qui j'ai particulièrement échangé.

Et il y a aussi les différents membres de l'équipe, permanents ou transitoires. Je commencerai par Erwin avec qui j'ai eu le plaisir de débiter ma thèse. Même s'il est étourdi au point d'en oublier ses repas, il reste une personne très sympathique et agréable à côtoyer. Puis est arrivé Capitaine Pierre. Bien que nous n'ayons travaillé que trois mois ensemble, les petites blagues que nous pouvions nous faire garantissaient la bonne humeur tous les jours et cette période restera celle où il était le plus agréable pour moi de venir travailler. Je pense que les épisodes des recettes de gâteaux au chocolat, le 1^{er} avril et les diverses modifications apportées par mes soins à son ordinateur doivent encore être ancrées dans sa mémoire. J'ai aussi apprécié de travailler avec les différents stagiaires qui se sont succédés au laboratoire et plus particulièrement Véronique et Nikiforos à qui j'avais donné un surnom affectueux. Je voudrais aussi remercier Marina, Marta et Maxime pour leur aide scientifique, ainsi que Zohra que j'apprécie beaucoup bien qu'elle ait menacé plusieurs fois de me taper et Marc pour ses idées loufoques et ses sujets de conversations toujours très drôles. Mais je tiens tout particulièrement à remercier Stéphanie et Claire qui

m'ont aidé à rendre plus facile ces 3 années. Malgré mes blagues pas toujours très fines elles ont réussi à me supporter et me soutenir et pour ça elles méritent une médaille ! Et je suis très content de les avoir maintenant comme amies. Et enfin je tiens à remercier sincèrement mon directeur de thèse, Antonin qui a su m'encourager, me remotiver, m'écouter, me conseiller au bon moment pendant toute la durée de ma thèse. Je peux vraiment dire que j'ai eu un bon chef et je l'en remercie.

Je tiens aussi à remercier mes parents, mes frères ma sœur et mes belles-sœurs qui m'ont soutenu, encouragé, supporté lors de ces 3 ans, après l'avoir aussi fait pour un de mes frères qui a déjà passé brillamment sa thèse. Je remercie aussi à cette occasion ma sœur Amandine qui a corrigé les fautes d'orthographe de ce manuscrit et dieu sait qu'il y en avait. Je doute qu'il en reste puisqu'elle a bien fait son travail. Et puis je tiens à remercier mes grands-parents qui ont eux aussi participé à ma thèse en surjetant les velours indispensables à mon travail.

Je voudrai aussi remercier tous mes amis qui ont eu la bonté de se marier ces 3 dernières années : Olivia et Mathieu, Camille et Yves, Oscar et Nathalie, Agathe et Romain, Pierre-Antoine et Anne ainsi que Jason et Lenka. Ces différentes occasions m'ont permis de m'aérer la tête pour repartir de plus belle.

Je ne voudrais pas oublier les personnes avec qui j'ai travaillé durant mon monitorat : Sylviane, Emmanuelle et Robert. Ce fut un plaisir de travailler avec vous. Les 3 semaines à vos côtés m'ont permis de confirmer ce que je savais déjà : je suis fait pour l'enseignement. Merci d'avoir partagé avec moi votre expérience.

Enfin je voudrais terminer en remerciant ma compagne, Véronique. Sans elle je ne serai pas allé bien loin dans ma thèse. Elle m'a, plus que n'importe qui, aidé, encouragé, réconforter, remotivé, soutenu afin que j'aie au bout de cette aventure même dans les moments les plus difficiles. Merci.

Merci à tous de votre soutien !

Table des matières

PREMIER	CHAPITRE : INTRODUCTION	10
.	<i>LES ARNnc EUCARYOTES</i>	10
I.	<i>Petits ARN non codants chez les eucaryotes :</i>	11
II.	<i>Les grands ARN non codants chez les eucaryotes :</i>	18
III.	<i>Les ARN non codants chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i>	23
.	<i>LES ARNnc PROCARYOTES</i>	32
I.	<i>Synthèse</i>	32
II.	<i>Mode d'action</i>	34
III.	<i>Interaction ARN/protéine</i>	40
IV.	<i>Interaction avec l'ADN</i>	42
.	<i>MODIFICATION D'HISTONES ET ARNnc REGULATEURS</i>	45
I.	<i>Chromatine, histone et modifications post-traductionnelles</i>	45
II.	<i>Les histones déacétylases de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i>	47
III.	<i>Quelques exemples chez la levure : longs ARNnc et modifications d'histones</i>	49
DEUXIEME	CHAPITRE : RESULTATS ET DISCUSSION	55
.	METABOLISME DU GENE <i>TIR1</i>	55
I.	<i>Facteur de régulation du gène <i>TIR1</i></i>	55
II.	<i>Répression du gène <i>TIR1</i> après inactivation de <i>Xrn1</i></i>	57
III.	<i>Dynamique de l'extinction de <i>TIR1</i></i>	57
.	HISTONES DEACETYLASES ET GENES REPRIMES PAR DES XUT	63
I.	<i><i>Hda1</i> est nécessaire à la répression du <i>Ty1</i> et de <i>TIR1</i></i>	63
II.	<i>Etude du rôle du complexe <i>Hda1</i> dans la régulation de <i>TIR1</i></i>	66
.	HDA1 ET EXPRESSION DE <i>TIR1</i>	68
I.	<i>Rôle de <i>Hda1</i> dans l'induction de <i>TIR1</i></i>	68
II.	<i>Caractérisation du XUT antisens de <i>TIR1</i></i>	70
.	HDA1 ET ACÉTYLATION DES HISTONES	73
I.	<i><i>Hda1</i> et H3K18ac</i>	73
II.	<i>Importance de H3K14 et H3K18 dans la régulation de <i>TIR1</i></i>	75
.	ROLE DES DOMAINES DE HDA1	79
I.	<i>Structure de <i>Hda1</i></i>	79
II.	<i>Effet de la troncation de <i>Hda1</i> sur l'expression de <i>TIR1</i></i>	79
III.	<i>Effet des tronctions de <i>Hda1</i> sur l'acétylation H3K18</i>	83
IV.	<i>Effet des tronctions sur la localisation de <i>Hda1</i></i>	85
.	MECANISME D'ACTION DE HDA1	88
I.	<i><i>Hda1</i> et transcription de <i>TIR1</i></i>	88
II.	<i>Troncation de <i>Hda1</i> et transcription de <i>TIR1</i></i>	91
III.	<i><i>Hda1</i> et stabilité de <i>TIR1</i></i>	92
.	CARACTERISATION D'HYBRIDES ARN/ADN PAR L'ANTICORPS S9.6	100
I.	<i>Caractérisation de l'anticorps S9.6 in vitro</i>	100
II.	<i>Recherche d'hybride ARN/ADN in vivo</i>	103
III.	<i>Optimisation des paramètres d'immuno-précipitation</i>	105
TROISIEME	CHAPITRE : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	109
QUATRIEME	CHAPITRE : MATERIEL ET METHODES	113

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : les différentes classes d'ARN non codant	11
Figure 2 : mode de synthèse des petits ARN interférents	12
Figure 3 : modèle ping-pong de production des piARN	13
Figure 4 : Modèle de silence transcriptionnel et post transcriptionnel des centromères de <i>S. pombe</i>	15
Figure 5 : les différentes classes d'ARN non codant	19
Figure 6 : localisation de la transcription des différentes classes d'ARNnc	20
Figure 7 : Facteur de remodelage de la chromatine et transcription des ARNnc	27
Figure 8 : Mode de régulation des loci <i>GAL1-10</i> et <i>FLO11</i>	31
Figure 9 : ARN 6S et modification de l'activité de $\sigma 70$	33
Figure 10 : Zone d'interaction entre un ARNnc et un ARNm	35
Figure 11 : Effet de l'interaction d'un ARNnc sur la région 5' non traduite	36
Figure 12 : ARNnc et atténuation de transcription	37
Figure 13 : ARN double brin et dégradation.....	39
Figure 14 : ARNnc et interaction avec des protéines	41
Figure 15 : CRISPR et reconnaissance de l'ADN du soi.....	43
Figure 16 : Chromatine et modifications des histones.....	46
Figure 17 : Régulation du locus <i>PHO84</i> par un ARNnc	50
Figure 18 : Régulation du locus <i>GAL1-10</i> par un ARNnc	51
Figure 19 : Régulation du gène <i>TIR1</i>	56
Figure 20: inactivation de Xrn1 et expression de <i>TIR1</i>	58
Figure 21 : Cinétique d'induction et de répression.....	60
Figure 22 : Histones déacétylases et répression du gène <i>TIR1</i> et de <i>TY1</i>	64
Figure 23 : Expression de <i>TIR1</i> après induction à 10°C	69
Figure 24 : Etude des ARN antisens au locus de <i>TIR1</i>	72
Figure 25 : Acétylation en H3K18 au locus <i>TIR1</i>	74
Figure 26 : Mutations ponctuelles d'histones et expression de <i>TIR1</i>	77
Figure 27 : Troncation de Hda1 et expression de <i>TIR1</i>	81
Figure 28 : Troncation de Hda1 et H3K18ac au locus de <i>TIR1</i>	85
Figure 29 : Troncation de Hda1 et présence de Hda1 au locus de <i>TIR1</i>	86
Figure 30 : Effet de la délétion de <i>HDA1</i> et de <i>HDA3</i> sur la transcription de <i>TIR1</i>	89
Figure 31 : Troncation de Hda1 et transcription de <i>TIR1</i>	91
Figure 32 : Hda1 et stabilité de l'ARN de <i>TIR1</i>	93
Figure 33 : Modèles d'action de <i>TIR1axut</i>	95
Figure 34 : Spécificité et sensibilité de l'anticorps S9.6	101
Figure 35 : Immunoprécipitation de la chromatine avec l'anticorps S9.6	104
Tableau 1 : mode d'action des lincARN par interaction avec des protéines.....	22
Tableau 2 : Gènes interagissant avec Hda1.....	98
Tableau 3 : Listes des souches utilisées dans cette étude	119
Tableau 4 : Liste des amorces utilisées dans cette étude	121

Liste des Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ARNe : ARN épigénétique

ARNnc : ARN non codant

ARNdb : ARN double brin

ARNsb : ARN simple brin

ChIP : Chromatine Immuno-Précipitation

CUT : Cryptic Unstable Transcript

DNMT : DNA Methyl-Transférase

HDAC : Histone DéAcétylase Complex

HMT : Histone Methyl-Transférase

lancARN : long antisense ncRNA

lincARN : long intervening non coding ARN

miARN : micro ARN

MUT : Meiotic Unannotated Transcript

NAT : Natural Antisens Transcript

PA(L)R : Promoter Associated (Long) ncRNA

PASR : Promoter-Associated Small RNA

piARN : PIWI interacting ARN

PROMPT : PROMoter upstream Transcript

PTGS : Post-Transcriptionnal Gene Silencing

RITS : RNA Induced Transcriptional Silencing complex

siARN : small interfering ARN

spliARN : spliced-site RNA

SUT : Stable Unannotated Transcript

TASR : ¹Terminator-Associated Short ARN

TERRA : Telomeric Repeat-containing ARN

TGS : Transcriptionnal Gene Silencing

tiRNA : transcription initiation-associated RNA

TSSa-ARN : Transcription Start Site associated ARN

XUT : Xrn1 dependant Unstable non coding Transcript

Premier Chapitre : Introduction

Des analyses à grande échelle de transcriptomes d'organismes eucaryotes ont montré que la quasi-totalité de ces génomes sont transcrits. Des estimations faites à partir de l'analyse d'1% du génome ont suggéré que 98% du génome humain ^(2,3) et 85% du génome de la levure ⁽⁴⁾ sont ainsi transcrits. Des analyses plus précises du projet GENCODE v7 ont été publiées très récemment ⁽⁵⁻⁷⁾. Cette étude montre que 80% du génome humain est fonctionnel et que 66% est transcrit en ARN. Cette transcription de la presque totalité d'un génome est connue sous la notion de transcription « pervasive ». Ce terme, peut-être péjoratif, a donné lieu à de nombreux débats tantôt reflétant une affinité par défaut de l'ARN polymérase pour l'ADN nu sans rôle particulier, tantôt reflétant la réalité d'un promoteur et d'une régulation spécifique ⁽⁸⁻¹³⁾. De nombreuses études récentes ont pu mettre en évidence un très grand nombre de nouvelles familles d'ARN non codants (ARNnc) dont la fonction reste largement méconnue. Ces ARNnc sont différents des ARNnc bien connus comme les small nucle(ol)arARN, impliqués dans l'épissage des préARNm, les ARN de transfert et les ARN ribosomiques impliqués dans la traduction des ARNm.

. *Les ARNnc eucaryotes*

Les ARNnc peuvent être transcrits en orientation sens ou antisens par rapport à l'orientation du gène le plus proche. Ces ARN peuvent être stables c'est-à-dire à des niveaux d'expression comparables à des ARNm ou instables, ciblés par des machineries de dégradation particulières. Chez les procaryotes, la proportion d'ADN non codant est de moins de 25%, elle est de plus de 60% pour les plantes et les métazoaires et environ 98,5% chez l'Homme ⁽¹⁴⁾. Cette proportion semble augmenter avec la complexité des génomes. Pour les organismes les plus complexes, la transcription pervasive peut donc constituer un nouveau niveau de régulation de la structure de la chromatine ou de l'expression des gènes ⁽¹⁵⁾. Les régulations ainsi mises en jeu peuvent être plus complexes et plus fines. Etant donné que la synthèse d'un ARN est plus rapide que la synthèse d'une protéine, qui demande la synthèse préalable d'un ARN, la transcription pervasive dans ces organismes leur permettrait de réagir plus vite aux changements de l'environnement. De plus, les effets des ARNnc peuvent être transcriptionnels ou post-transcriptionnels ce qui entraîne une plus grande variabilité phénotypique.

Le plus simple critère de classification est la taille de ces ARNnc. De 17 à 200nt ces ARNnc sont désignés comme petits. Au-delà de 200nt ils font parties des grands ARNnc. Ces deux classes sont ensuite divisées en sous-familles en fonction de leurs caractéristiques, de leurs fonctions et de leurs modes d'action. Le projet GENCODE a ainsi identifié 9000 petits ARNnc provenant de 9000 loci, de 15000 longs ARNnc provenant de 9640 loci et de 14000 transcrits provenant de 11900 loci dans 16 lignées cellulaires humaines différentes (⁵⁻⁷). Pour la première fois le nombre de loci non codants (24000) dépasse le nombre de loci codants (21000).

I. Petits ARN non codants chez les eucaryotes :

Les petits ARNnc ont des tailles comprises entre 17 et environ 200nt. Les petits ARNnc peuvent être subdivisés en courts ARN interférents (siARN), courts ARN non codants (sARN) (figure 1).

1. Les courts ARN non codants

a. Caractéristiques générales

Cette sous-classe inclue les petits ARN interférents (siRNA, ¹⁶), les ARN interagissant avec PIWI (piARN, ¹⁷), et les micros ARN (miARN, ¹⁸). Ces ARNnc ont des tailles respectivement comprises entre 19-30nt, 24-31nt et 21-25nt. Les piARN sont classés en trois sous-types différents tous associés à des répétitions de séquences. Ce sont les répétitions associées aux siRNA (repeat-associated siARN ou rasiARN) (¹⁹), les si ARN associés aux centromères (crasiARN, ²⁰) et les sARN associés aux télomères (tel-sARN, ²¹).

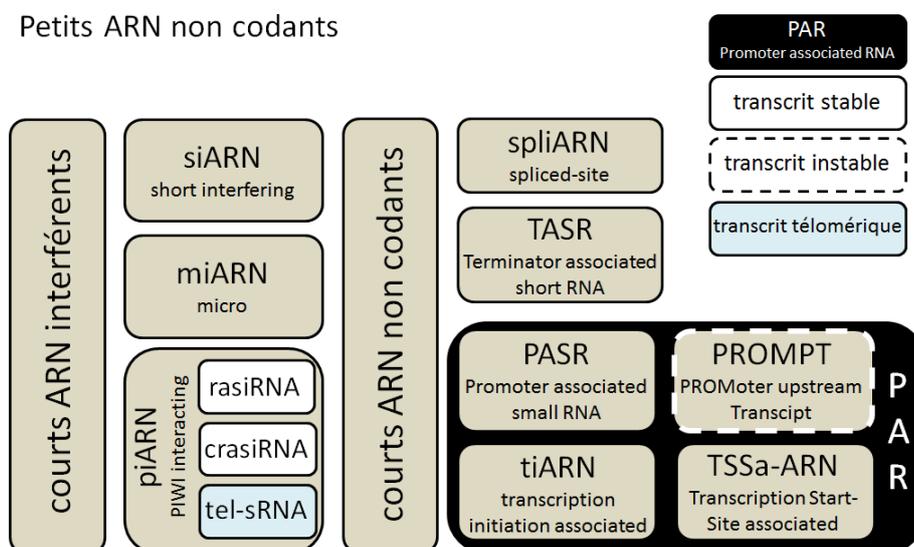


Figure 1 : les différentes classes d'ARN non codant

Les différentes classes de petits ARNnc. Adapté de Tisseur et al, Biochimie, 2011

b. Synthèse

Les siARN proviennent de la digestion par Dicer d'ARNdb. Ces ARNdb peuvent provenir de régions répétées comme les transposons, les centromères ⁽²²⁾. Des transcrits naturellement antisens (Natural Antisens Transcript ou NAT, voir plus loin) peuvent aussi former des ARNdb avec l'ARNm dont ils sont antisens ⁽²³⁻²⁵⁾ (figure 2).

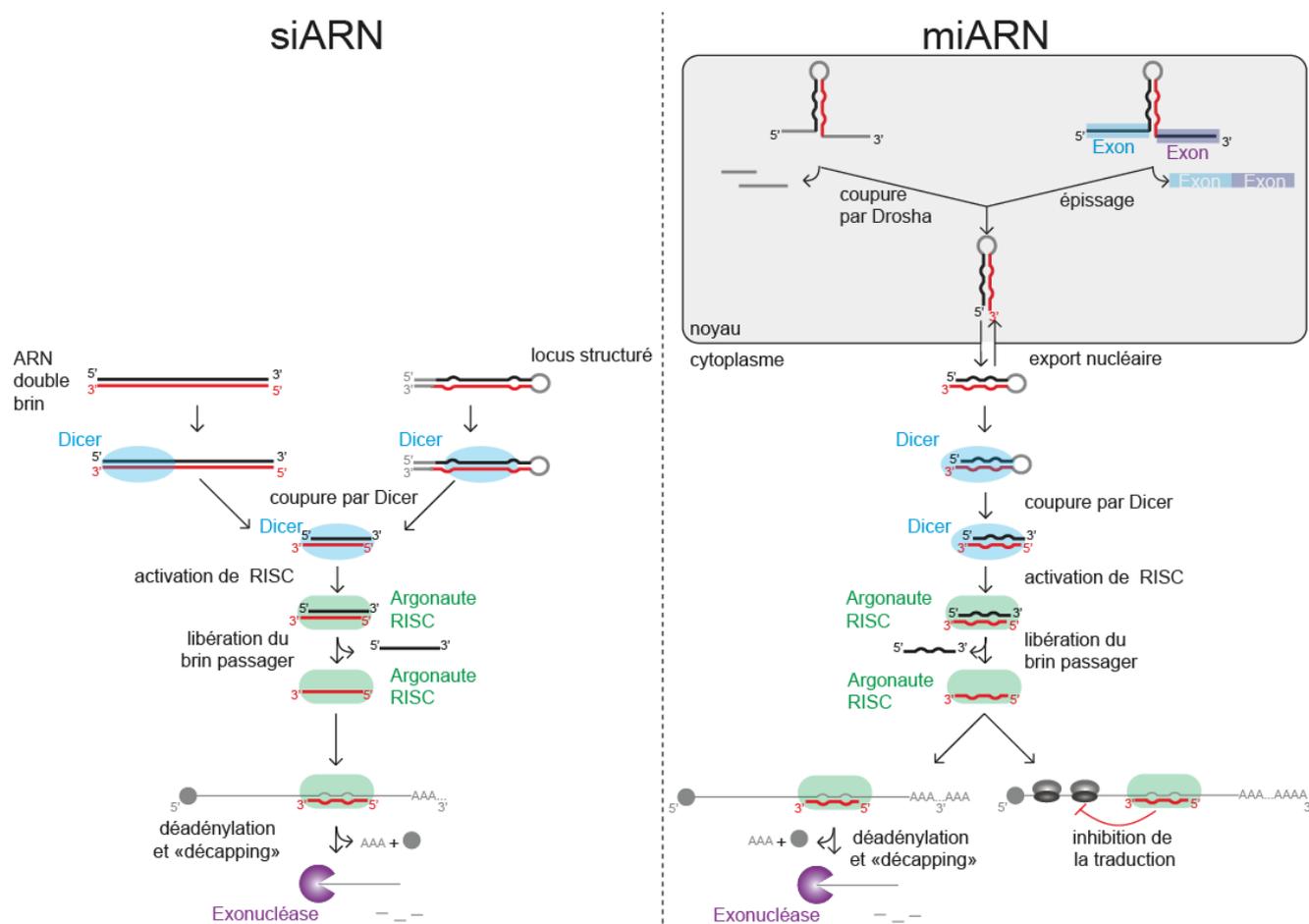


Figure 2 : mode de synthèse des petits ARN interférents

Les siARN sont produits à partir de la digestion d'ARN double-brin (ARNdb) par Dicer. Ces ARNdb proviennent d'ARN antisens ou d'un ARN qui se replie en épingle à cheveu. Les ARN ainsi formés sont chargés sur une protéine Argonaute qui peut ainsi se fixer sur les ARNm cible et entraîner leur dégradation après déadénylation et « décapping ».

Les pri-miARN sont obtenus à partir d'un seul ARN. Cet ARN peut contenir deux exons dans le cas des mirtrons. Ces ARN sont maturés par Drosha et exportés dans le cytoplasme où Dicer clive la boucle. Les ARN sont ensuite chargés sur une protéine Argonaute qui peut ainsi se fixer sur les ARNm cible et entraîner leur dégradation après déadénylation et « décapping » ou empêcher la traduction.

Les miARN sont transcrits par les ARN polymérase II et III sous forme de pri-miRNA coiffés et poly-adenylés (^{26,27}). Certains miARN sont transcrits à partir de leur propre promoteur (²⁷⁻³¹). Leur expression est variable au cours du développement (^{28,32,33}). Les autres miARN sont transcrits à partir d'introns en orientation sens ou antisens. Leur expression est corrélée à l'expression du gène dans lequel ils sont situés (³⁴⁻³⁹). Le pri-miARN est digéré par la ribonucléase Drosha pour former le pré-miARN qui a une structure en tige-boucle (^{40,41}). Il existe d'autres sources de pre-miARN. Ces pre-miARN atypiques sont appelés mirtrons. Ils ont initialement été découverts chez la drosophile (³⁴) et jusqu'à récemment seuls 10 mirtrons avaient été identifiés chez l'Homme (⁴²). Récemment 237 et 240 mirtrons ont été identifiés respectivement chez le rat et l'Homme (⁴³). Ces pri-miARN se présentent sous la forme de deux exons séparés par un intron en forme d'épingle à cheveu. Le pre-miARN est relâché suite à l'épissage du pri-miARN. La boucle du pre-miARN est ensuite enlevée pour terminer la genèse des miARN (^{34,35}). Ces ARNdb sont ensuite clivés par Dicer (⁴⁴⁻⁴⁷). Les petits ARN ainsi synthétisés sont pris en charge par une protéine Argonaute (figure 2).

Les piARN sont généralement produits à partir d'ARN simple brin (ARNsb) par un mécanisme ping-pong qui n'implique pas Dicer (figure 3).

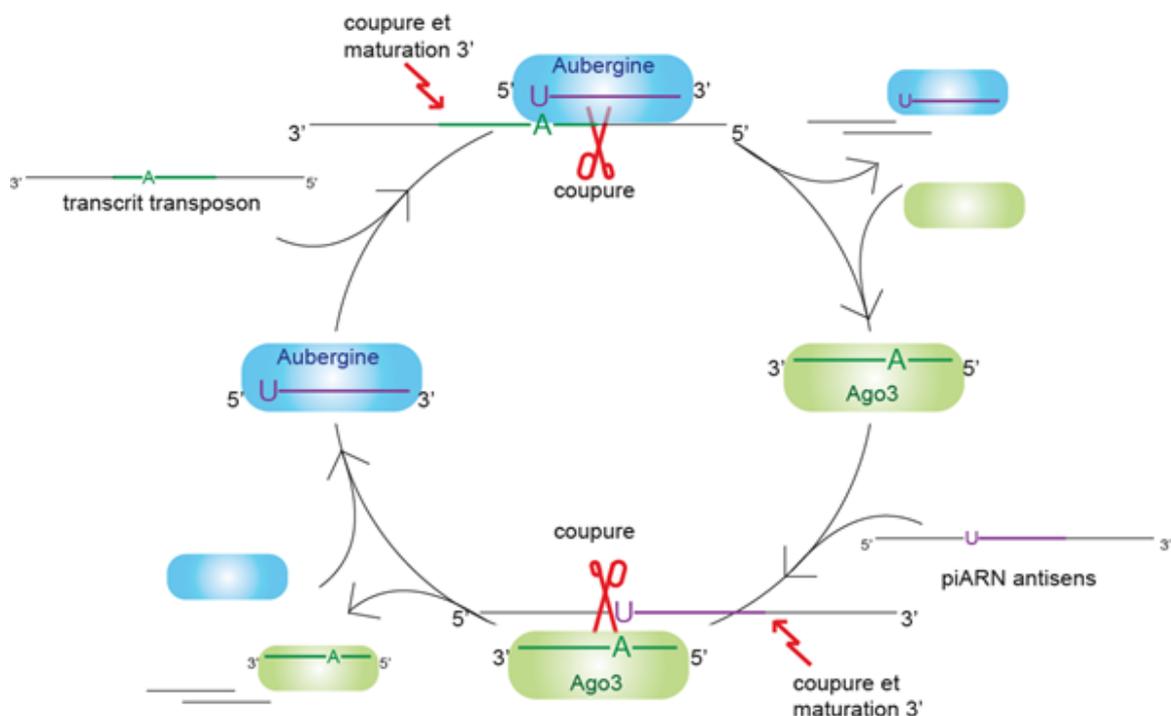


Figure 3 : modèle ping-pong de production des piARN

Un piARN déjà synthétisé chargé sur la protéine Aubergine peut s'hybrider à un ARN provenant de séquences répétées. Cette interaction entraîne le clivage de l'ARN 10 nucléotides en amont du A. Cet ARN est mûri pour produire un nouveau piARN. Ce piARN est chargé sur une protéine Ago3 qui peut cibler un ARN provenant de séquences répétées. Ceci entraîne une coupure de l'ARN au niveau de l'uracile. L'ARN ainsi formé est mûri et chargé sur Aubergine. Adapté de Aravin et al, Mol Cell, 2008.

Ce mécanisme reste actuellement encore très mystérieux mais les étapes de maturation font intervenir Argonaute ayant la capacité d'hydrolyser l'ARNm. Pour le transposon, des piARN sont capables d'interagir avec Piwi ou Aubergine. Ce complexe est capable de se fixer sur l'ARNm du transposon. Cette fixation entraîne le clivage de l'ARNm du transposon en petit ARN. Cet ARN est pris en charge par la protéine Ago3. Ce complexe est capable de reconnaître le transcrit contenant la séquence du piARN. Cette reconnaissance conduit au clivage de l'ARN et donc à la production du piARN (⁴⁸).

c. Modes d'action

Les régulations des cibles de ces ARNnc peuvent être co- ou post-transcriptionnelles. La régulation co-transcriptionnelle passe par le silence transcriptionnel du gène (Transcriptional Gene Silencing ou TGS), modifications de l'état de condensation de la chromatine, méthylation de l'ADN et modifications post-traductionnelles des histones (⁴⁹).

Le TGS est impliqué dans le silence de la transcription des centromères et des régions impliquées dans la détermination du type sexuel chez *Schizosaccharomyces pombe* (⁵⁰) (figure 4). Des siARN interagissent avec le complexe ARC contenant les protéines Argonaute, Arb1 et Arb2. Arb1 et Arb2 sont ensuite remplacées par Tas3 et Chp1, pour former le complexe RITS (RNA Induced Transcriptional Silencing complex). Un des deux brins de l'ARNdb est dégradé. Grâce au brin toujours intact le complexe RITS est capable d'interagir avec un ARN néo-naissant transcrit au niveau du centromère. Le recrutement du complexe RITS au niveau de la chromatine centromérique entraîne le recrutement du complexe CLRC. Le recrutement de ce complexe induit la méthylation de H3K9 grâce à l'histone méthyl-transférase Clr4. Cette méthylation est reconnue par la protéine Swi6 elle-même reconnue par la protéine HP1 ce qui va conduire à une condensation de la chromatine centromérique. L'interaction du complexe RITS avec l'ARN néo-naissant provoque le clivage de cet ARN et la dissociation du complexe RITS. Le siARN hybridé à l'ARN cible est un substrat pour le complexe RDRC. Ce complexe contient une ARN polymérase ARN dépendante. Elle va synthétiser un brin complémentaire à partir du siARN en utilisant l'ARN cible comme matrice. Cette transcription entraîne la formation d'un long ARNdb qui sera ensuite clivé par Dicer pour générer de nouveau siARN (⁵¹).

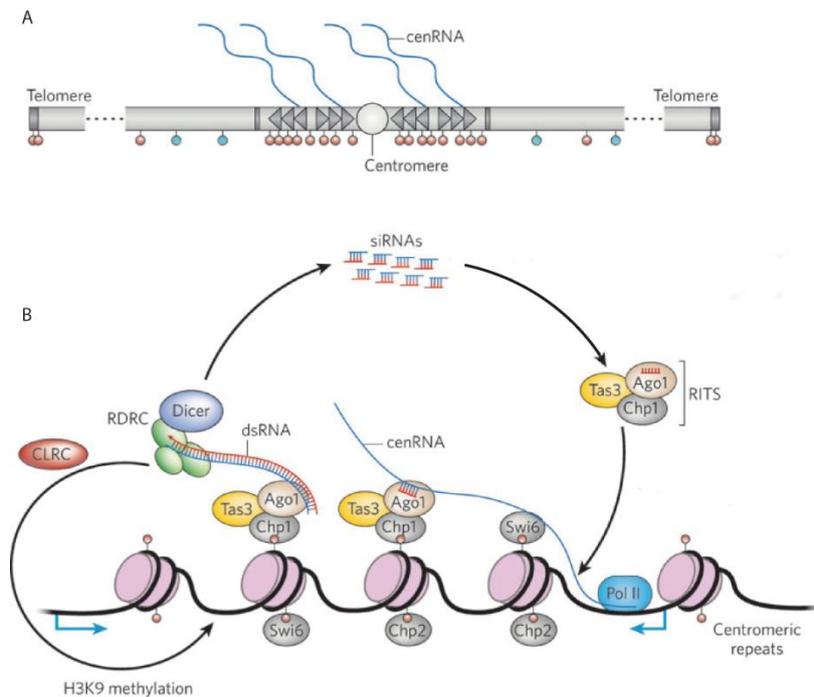


Figure 4 : Modèle de silence transcriptionnel et post transcriptionnel des centromères de *S. pombe*

A) Structure des centromères chez *S. pombe*. Les centromères contiennent des régions répétées qui sont transcrites en ARN centromériques. La région centromérique porte des marques d'hétérochromatine comme H3K9me2/3 (boules rouges).

B) Modèle de silence des centromères. Les siARN générés à partir des transcrits centromériques sont pris en charge par le complexe RITS. Le siARN du complexe RITS peut se fixer sur un ARN centromérique en cours de synthèse. Cette fixation entraîne le recrutement de l'histone méthyltransférase CLR4 qui méthyle H3K9. H3K9me2/3 est ensuite reconnue par Chp1 et Chp2, ce qui conduit à la condensation de la chromatine. Adapté de Moazed, Nature, 2009.

Les piARN sont capables d'agir *en trans* sur un locus différent de celui où ils ont été transcrits. Chez la drosophile des piARN produits à partir du locus Flamenco sont capables de cibler des transposons situés sur d'autres chromosomes (⁵²). De plus dans les lignées germinales de testicules de rat, des piARN entraînent la méthylation de l'ADN correspondant à des transposons (⁵³⁻⁵⁵) grâce aux ADN méthylases Dnmt3A et Dnmt3L (⁵⁶⁻⁵⁹) par un ciblage qui reste encore mal connu. Ce ciblage a aussi été mis en évidence chez *C. elegans* (⁶⁰).

En outre, des ARN peuvent induire une répression d'ADN « étranger », répression qui sera transmise à la descendance chez *C. elegans*. De tels ARN ont été découverts très récemment et nommés ARN épigénétiques (ARNe) (⁶¹). Ces ARNe sont produits à partir d'un

gène uni-copie introduit par génie génétique grâce à la technique MosSCI⁽⁶²⁾. La transcription de ces ARNe s'accompagne d'un silence du gène intégré associé à la marque épigénétique H3K9me3. Une telle modification des histones avait déjà été mise en évidence dans le cas de gènes multi-copies⁽⁶³⁾. Ce silence fait intervenir une protéine PIWI Argonaute appelée PRG-1. Le silence est maintenu grâce à des protéines WAGO ainsi que par des éléments de la voie d'ARN interférence (voir plus bas). La drosophile possède donc un système lui permettant d'avoir une mémoire du soi et du non-soi au niveau de l'ADN qui est trans-générationnelle.

La régulation post-transcriptionnelle passe par le silence du gène (Post-Transcriptional Gene Silencing ou PTGS). Cette régulation implique une interaction avec l'ARNnc et l'ARNm cible. Cette interaction peut être parfaite si l'ARNnc est antisens de l'ARNm ou imparfaite. Ces interactions imparfaites augmentent le nombre de cibles potentielles d'un petit ARNnc. En général l'interaction parfaite entraîne un clivage de l'ARNm cible grâce à l'activité endonucléase d'Argonaute. L'interaction imparfaite est plutôt associée à un blocage ou une facilitation de la traduction de l'ARNm cible⁽⁶⁴⁻⁶⁷⁾. Beaucoup de miARN interagissent avec la région 3' non traduite des ARNm cibles⁽⁶⁸⁾. Dans ce cas-là le mécanisme affectant la traduction n'est pas très bien connu. Cependant l'interaction imparfaite peut aussi induire une dé-adénylation de l'ARNm cible et donc une accélération de sa dégradation⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾. De manière générale le TGS implique surtout des siARN alors que le PTGS implique surtout des miARN ou des piARN⁽⁴⁹⁾. De plus les effets du TGS sont à plus long terme que le PTGS.

d. Fonction

Ces ARNnc sont impliqués dans la régulation de l'expression d'un ou de plusieurs gènes, dans les silences d'éléments génétiques « égoïstes » tels les transposons et le contrôle de la réponse anti-virale. Plus précisément les rasiARN contrôlent l'abondance des transposons et rétrotransposons dans la lignée germinale mâle^(17,53,54). Les tel-ARN sont des ARN associés à la chromatine rencontrés dans des lignées de cellules souches embryonnaires⁽²¹⁾. Les crasiARN sont transcrits depuis des régions satellites mais leur fonction n'est pas encore bien caractérisée⁽²⁰⁾. Le mécanisme d'action exacte des piARN n'est pas encore connu mais il est intéressant de noter que les transposons, les centromères et les télomères ont des structures proches en terme d'architecture hétérochromatinienne. La régulation de la

structure de ces régions est cruciale pour le maintien de la stabilité du génome et de la correcte ségrégation des chromosomes.

2. Les petits ARNnc

a. Caractéristiques générales

Classiquement ces ARN sont divisés en 8 catégories différentes: les ARN associés au site d'épissage (spliced-site RNA ou spliRNA,¹), les courts ARN associés à la terminaison de la transcription (Terminator-Associated Short ARN ou TASR,²) et les ARN associés aux promoteurs. Parmi cette dernière catégorie se trouvent les petits ARN associés aux promoteurs (Promoter-Associated Small RNA ou PASR,²), les ARN associés à l'initiation de la transcription (transcription initiation-associated RNA ou tiRNA,⁷²), les ARN associés au site d'initiation de la transcription (Transcription Start Site associated ARN ou TSSa-ARN,⁷³) et les transcrits en amont des promoteurs (PROMoter upstreAM Transcript ou PROMPT,²) (figure 1). Les spliARN sont localisés spécifiquement dans le noyau et ont une taille de 17-18nt. Ils correspondent parfaitement au site donneur d'épissage à l'intérieur des exons. Ces ARN sont surtout identifiés dans les gènes très exprimés. Ils ont une expression liée au stade de développement (¹). Les TASR sont plus longs, leur taille est inférieure à 200nt et ils ont été identifiés dans des cellules humaines. Les PASR ont aussi une taille inférieure à 200nt et ont la particularité de posséder une coiffe. Ils ont été identifiés chez l'Homme. Les tiARN ont une taille de 18nt. Ils ont été identifiés chez la drosophile, le poulet et l'Homme. Les TSSa-ARN, identifiés chez la souris, ont une taille de 20 à 90nt (figure 1).

Les PROMPT ont été identifiés chez l'Homme. Ils ont la particularité d'être instables. Ils ont été identifiés après déplétion de l'exosome dans des cellules humaines. Ils sont associés au promoteur des gènes actifs. Les PROMPT pourraient correspondre à une forme allongée des PASR (⁷⁴). C'est pour cette raison que, bien que leur taille ne soit pas connue nous avons classé les PROMPT dans les petits ARNnc.

b. Synthèse/Mode d'action

Les modes de synthèse et d'action de ces ARN sont encore très mal connus. Les spliARN, TASR et tiARN pourraient provenir d'un ARN naissant qui aurait subi l'action de TFIIS. La coupure dépendante de TFIIS pourrait provoquer un retour en arrière de l'ARN polymérase II, produisant ainsi un cycle de très courtes transcriptions conduisant à la production de ces petits ARN.

c. Fonction

Leurs fonctions ne sont pas encore très bien identifiées. Une hypothèse est qu'il pourraient intervenir au niveau des promoteurs et des terminateurs. Ils pourraient aussi être impliqués dans la formation d'une boucle au niveau d'un gène qui rapprocherait ainsi le promoteur du terminateur. (^{72,73,75}). Cette circularisation permettrait un recyclage très rapide d'ARN polymérase qui une fois libérée au niveau du terminateur pourrait directement être utilisée au niveau du promoteur. Les spliARN et les tiARN pourraient être impliqués dans la pause de l'ARN polymérase II et dans le déplacement des nucléosomes (⁷⁶). Les petits ARNnc n'ayant pas encore été mis en évidence chez *Saccharomyces cerevisiae* nous ne donnerons pas plus de détails sur ces ARN.

II. Les grands ARN non codants chez les eucaryotes :

Les grands ARNnc ont une taille supérieure à 200nt. Ils peuvent être très grands (jusqu'à 100kb). Les grands ARNnc des eucaryotes en général sont présentés en premier. Les ARNnc de *Saccharomyces cerevisiae* seront étudiés ensuite.

1. Caractéristiques générales

Ces ARNnc peuvent être classés dans 5 groupes distincts (figure 5) : les longs ARN intercoupants (long intervening ncARN ou lincARN, ⁷⁷), les ARN associés aux exhausteurs (enhancer associated ARN ou eARN et enhancer-like ARN, ⁷⁸), les longs ARN antisens et les transcrits naturellement antisens (long antisense ncRNA ou lancARN et Natural Antisens Transcript ou NAT, ²⁵), les ARN associés aux répétitions télomériques (Telomeric Repeat-containing ARN ou TERRA, ⁷⁹⁻⁸¹) et les longs ARN associés aux promoteurs (Promoter-associated Long ARNnc ou PAR, ⁸²). Les lancARN et les NAT ont tout d'abord été identifiés chez les plantes (²⁵). Les eARN ont une taille inférieure à 2kb, ils sont transcrits par l'ARN polymérase II mais non polyadénylés. Ils ont été identifiés dans des neurones de souris et dans des cellules humaines (2000 chez la souris, 3000 chez l'Homme). Les quantités d'eARN produites à partir d'une séquence enhancer sont directement corrélées à la quantité d'ARNm du gène contrôlé (⁷⁸). Les ARNnc TERRA ont une taille comprise entre 300nt et 100kb. Les lincARN sont des ARN très répandus. Chez la souris des analyses *in silico* ont mis en évidence environ 1600 linc (⁷⁷). Selon ENCODE en 2012 il y aurait 5094 lincARN chez l'Homme. Ils sont transcrits de manière très proche des

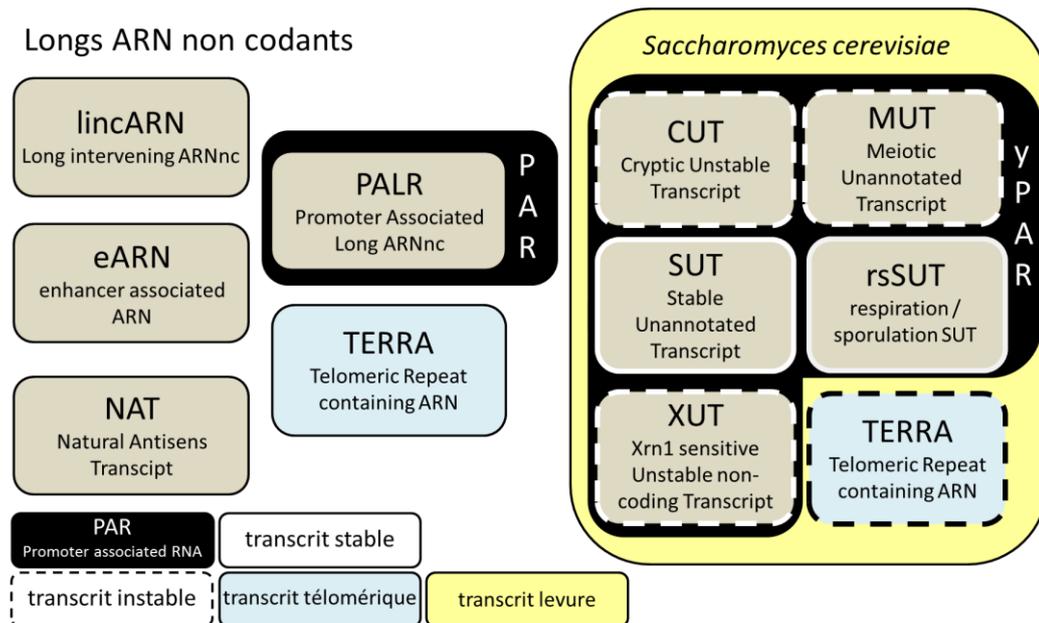


Figure 5 : les différentes classes d'ARN non codant

Les différentes classes de longs ARNnc. Adapté de Tisseur et al, Biochimie, 2011.

ARNm et ils sont associés aux mêmes modifications d'histones (H3K4me2, H3K4me3, H3K27ac) au niveau du site d'initiation de la transcription. Ils sont souvent associés à des marques de silence comme H3K27me3 et H3K36me3. Les mutations dans les lincARN ont un taux proche d'une séquence neutre alors que pour les promoteurs ce taux est au moins égal à celui des gènes codant montrant une remarquable conservation des promoteurs des lincARN. De manière intéressante, dans les 16 lignées cellulaires étudiées dans le projet ENCODE, les quantités de lincARN sont plus faibles que celles des ARNm. En revanche les lincARN sont beaucoup plus spécifiques de certains types cellulaires. Alors que plus de 65% des gènes sont exprimés dans les 16 lignées cellulaires étudiées, seulement 10% des lincARN le sont. De plus, près de 30% des lincARN sont identifiés dans une ou deux lignées alors que seuls 6% des gènes codant sont dans ce cas ⁽⁶⁾. Les lincARN semblent donc plus liés à la différenciation cellulaire que les ARNm.

2. Synthèse

Les modalités de transcription de ces ARNnc ne sont pas encore clairement identifiées bien que quelques exemples soient connus. La transcription de plusieurs lincARN est contrôlée par des facteurs de transcription comme Sox2, Nanog, p53 et Oct4 ⁽⁸³⁾. De

manière intéressante les lincARN sont souvent localisés près de gènes impliqués dans la transcription (⁷⁷). Le niveau d'expression de TERRA est contrôlé par l'état physiologique de la cellule comme le stress, le cycle cellulaire, la cancérisation ainsi que par son stade de développement (⁸⁴). Un schéma récapitulant les différentes classes d'ARNnc ainsi que la localisation de la transcription est présenté en figure 6.

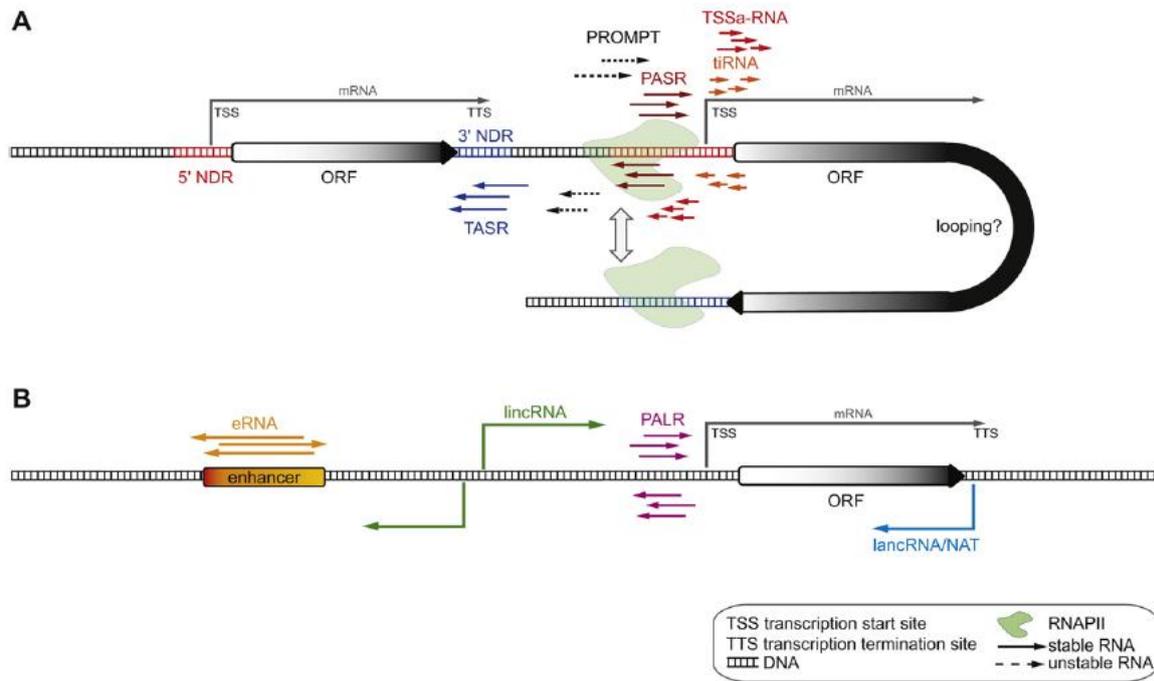


Figure 6 : localisation de la transcription des différentes classes d'ARNnc

A) Transcription des courts ARNnc.

B) Transcription des longs ARNnc.

La majorité des ARNnc est synthétisée à partir des régions pauvres en nucléosomes et en particulier au niveau des promoteurs.

Adapté de Tisseur et al, Biochimie, 2011

3. Mode d'action

TERRA interagit avec la télomérase *in vitro* et cette interaction l'inhibe. De plus TERRA interagit avec des protéines nucléaires ce qui a un impact sur sa quantité et sa localisation (⁸⁵).

a. Effet sur la transcription

Les lincARN sont responsable de TGS en grande partie. Plusieurs exemples commencent à être bien connus (table 1). Ces ARNnc sont capables d'agir en *cis* ou en *trans*

et de recruter des facteurs de remodelage de la chromatine ou de méthylation de l'ADN afin de changer l'état de la chromatine. Les effets peuvent être restreints à un gène, affecter plusieurs gènes voire même un chromosome entier dans le cas de XIST. BC1 est capable d'interagir avec eIF4E et la polyA binding protein afin de moduler de manière globale la transcription de gènes (⁸⁶).

b. *Effet sur l'épissage et la stabilité des ARNm*

Les longs ARNnc peuvent avoir un effet sur l'épissage des ARNm (MALAT1) mais aussi sur la stabilité des ARNm. L'ARNnc BACE1-AS (antisens de BACE-1) est capable d'interagir avec l'ARNm de BACE-1 ce qui entraîne une stabilisation de l'ARNm (⁸⁷). 1/2-sbs ARN interagit avec des ARNm contenant des séquences Alu et provoque une déstabilisation de ces ARNm (⁸⁸).

c. *Effet post-transcriptionnel*

Certains longs ARNnc ont aussi un effet post-transcriptionnel. linc-p21 peut interagir avec Rck et Fmrp pour bloquer la traduction des ARNm cibles de la β -caténine et de JunB (⁸⁹). L'ARNnc AS-Uchl1 (antisens de Uchl1) interagit avec l'ARNm de Uchl1 et active sa traduction (⁹⁰).

d. *Effet sur le miARN*

Certains longs ARNnc sont capables d'interagir avec des miARN et empêchent leur action. linc-MD1 a ainsi un effet protecteur sur les gènes MAML1 et MEF2 (⁹¹). BACE1-AS bloque l'action de miR-485-5p (⁹²). H19 est capable de favoriser l'action de miR-675 sur l'ARNm de IGFR1 et de diminuer ainsi son expression (⁹³).

4. Fonction

Les lincARN ont été identifiés comme intervenant dans la compensation de dose (^{94,95}), le développement et la différenciation cellulaire, l'architecture de la chromatine et des chromosomes (^{96,97}). De plus la localisation des lincRNA suggère un rôle général dans les processus de transcription. Ces ARNnc pourraient activer ou réprimer des réseaux entiers de transcription. Etant donné que l'expression de ces ARN est corrélée avec le niveau d'ARNm du gène contrôlé il est possible que ces ARNnc interviennent dans le recrutement de la machinerie de transcription ou fassent en sorte que le promoteur du gène puisse être actif. Le nombre de eARN chez la souris et l'Homme laisse supposer que ce mécanisme est universel.

long ARNnc	protéines impliquées	Fonctions	organisme	Référence
SRA	CTCF	augmente la fonction d'insulateur de CTCF	Homme	98
pRNA	DNMT3b	cible DNMT3b au niveau de l'ADNr via une triple hélice ARN/ADN/ADN	Homme	99
Air	G9a	recrute l'histone méthylase G9a <i>en cis</i>	Souris	100
Gas5	récepteur aux glucocorticoïdes	piège les récepteurs aux glucocorticoïdes	Homme	101
lincARN p21	interagit avec hnRNP-K en trans	réprimer des gènes cibles de p53	Homme	102
HOTAIR	LSD1-CoREST	cible le complexe LSD1 qui déméthyle H3K4me2	Homme	103
	PRC2	recrute PRC2 en trans, induit H3K27me et la répression de gènes du développement	Homme	104
HOTTIP	MLL-WDR5	se fixe au complexe MLL et H3K4me3 ce qui favorise l'activation de gènes	Homme	105
PANDA	NF-YA	titre NF-YA pour favoriser la survie cellulaire lors de dommage à l'ADN	Homme	106
ANRIL	PRC1	recrute le complexe PRC1 au niveau du gène p16INK4A	Homme	107
Xist	PRC1	recrute le complexe PRC1	Homme	108
	PRC2	recrute PRC2 en trans, induit H3K27me et la répression d'un chromosome X	Homme	94,103
COLDAIR	PRC2	recrute PRC2 en trans, induit H3K27me	Végétaux	109
MALAT1	facteurs d'épissage riche en proline/sérine	séquestre ces facteurs d'épissage	Homme	110
1/2 SBS ARN	Staufen	interaction avec ARNm contenant des séquences Alu et adressage au nonsense-mediated decay (NMD)	Homme	88
TERRA	hnRNP-A	contrôle l'accès de la télomérase aux télomères	Homme	111

Tableau 1 : mode d'action des lincARN par interaction avec des protéines

Colonne 1 : lincARN.

Colonne 2 : Protéine interagissant avec le lincARN.

Colonne 3 : fonction du complexe ribonucléoprotéique.

5. Autres exemples

Les ARNnc TERRA sont impliqués dans le métabolisme des télomères c'est-à-dire leur taille et leur structure. TERRA est un composant des télomères. De récentes analyses transcriptomiques à grande échelle ont permis de mettre en évidence un nombre non négligeable d'ARNnc antisens de gènes. La transcription de ces ARNnc débute dans des introns, la région non traduite en 3' ou même dans les régions codantes (^{112,113}). Chez la souris environ 70% des transcrits pourraient former des paires sens/antisens, ce qui suggère un large rôle de ces ARNnc dans le contrôle de l'expression de ces gènes (⁷⁷). Cette régulation pourrait être due à de l'interférence transcriptionnelle. Il n'est pas non plus à exclure que ces ARN double-brins soient un substrat pour des protéines comme Dicer ce qui produirait ainsi des petits ARN interférents appelés endo-siARN (²²).

III. Les ARN non codants chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae ne possède aucun composant de la machinerie d'ARN interférence (¹¹⁴). Pourtant des homologues de Dicer et Argonaute ont été trouvés chez *Saccharomyces castellii* et *Kluveromyces lactis*, qui appartiennent toutes deux à la famille des levures bourgeonnantes (¹¹⁵). Cette absence d'ARN interférence pourrait s'expliquer par la résistance des levures dépourvues de ARNi au système killer des virus. En effet, de manière surprenante toutes les levures dépourvues d'ARNi résistent au système killer alors que toutes les levures contenant le RNAi meurent en présence du système killer (¹¹⁶). Depuis 2005 un certain nombre d'ARNnc a été découvert. Ces ARN peuvent être synthétisés à partir de régions inter ou intra-géniques, ils sont pour la grande majorité instables. Dans quelques cas le rôle de ces ARNnc ou de leur transcription est connu.

1. Transcription pervasive depuis les régions pauvres en nucléosomes à proximité du site d'initiation de la transcription

Comme le suggèrent de récents modèles, les régions pauvres en nucléosomes (Nucleosome Depleted Region ou NDR) au niveau des promoteurs favoriseraient la reconnaissance de ces régions par l'ARN polymérase (¹¹⁷). Ces régions peuvent entraîner l'initiation de la transcription de manière bidirectionnelle et ce bien que des éléments censés orienter la transcription soient présents. Ainsi de faible niveau d'ARNnc sont produits.

a. *Les ARNnc Cryptiques Instables CUT et XUT :*

Ce concept de transcription bidirectionnelle a été élaboré à partir de deux études de transcriptome réalisées pour identifier les ARN cryptiques instables (Cryptic Unstable Transcript ou CUT) (^{118,119}). Ces ARN sont dégradés de 3' vers 5' par la machinerie de dégradation nucléaire des ARN. Cette activité est portée par l'exosome. Ces ARN sont instables. Cette instabilité provient directement du mode de terminaison de la transcription qui dépend du complexe Nrd1/Nab3. Ce complexe est capable de se fixer sur un ARN naissant (¹²⁰) ce qui conduit à une interaction entre Nrd1 et l'extrémité C-terminale de l'ARN polymérase II. Ceci entraîne la terminaison de la transcription (^{121,122}). Le complexe Nrd1 est aussi capable d'interagir avec le complexe de polyadénylation TRAMP et l'exosome nucléaire (¹²³). La polyadénylation des CUT favorisant leur dégradation est ainsi facilitée. Les mécanismes permettant de différencier transcription pervasive et transcription d'un ARNm à partir d'un même promoteur ne sont pas encore connus. Cependant il est évident que la cellule est capable de faire la différence puisque la terminaison de la transcription des ARNm est dépendante des facteurs de coupure dépendant de la polyadénylation (Polyadénylation Cleavage Factor ou CPF, ¹²⁴). Il est donc clair que le mode de terminaison de la transcription détermine le devenir de ces ARN.

Les XUT sont instables et sensibles à l'exoribonucléase 5'-3' Xrn1. Ils ont été mis en évidence en 2011 dans le laboratoire (¹²⁵). Sur les 1658 XUT, 183 correspondent à des CUT, 531 à de SUT (voir plus bas) et 932 n'avaient jamais été identifiés. 66% des XUT sont antisens de gènes, 21% sont orientés dans le même sens que des gènes, 13% sont intergéniques. Les XUT sont synthétisés par l'ARN polymérase II, coiffés et polyadénylés. Sur les 986 XUT antisens, 296 XUT entraînent une diminution de l'expression du gène correspondant. L'inactivation de Xrn1 grâce à une mutation thermosensible montre que les XUT sont extrêmement sensible à Xrn1 et que l'accumulation des XUT précède la diminution de l'ARNm du gène correspondant. Lorsqu'un stress est provoqué avec du chlorure de lithium, les XUT s'accumule (¹²⁵). Récemment il a été montré que la perte de l'enzyme qui enlève la coiffe des ARN Dcp2 entraîne une stabilisation d'ARNnc dont la plupart correspondent à des XUT, confirmant ainsi la voie de dégradation de ces ARN de 5' vers 3' (¹²⁶).

b. *Les ARNnc stables non caractérisés SUT*

Ces ARNnc ont été identifiés par le groupe de Lars Steinmetz lors de la même étude qui a conduit à la caractérisation systématique des CUT. Ils sont insensibles à l'activité de l'exosome. Ils sont donc présents dans une souche sauvage. Leur quantité dans la cellule est cependant moins importante (¹¹⁸). Leur faible abondance pourrait provenir du fait qu'ils soient sensibles à l'activité de l'exonucléase 5'-3' cytoplasmique Xrn1 (¹²⁵). Tout comme pour les CUT, les SUT doivent porter un signal qui les rend sensibles à l'activité d'une ribonucléase, en l'occurrence Xrn1.

c. *Mode d'action des CUT*

La plupart des CUT et des SUT sont associés au promoteur des gènes dont la transcription est effectuée par l'ARN polymérase II. Ces ARNnc peuvent donc être classés dans la catégorie des PAR (Promoter Associated RNA) par homologie au même type d'ARNnc identifiés chez les Eucaryotes supérieurs. Etant donné que ces ARN ont été identifiés chez la levure cette catégorie est appelée plus précisément yPAR (yeast PAR). La majorité de ces ARNnc est transcrite en orientation antisens par rapport au gène avec lequel ils partagent le promoteur. En outre, le niveau de ces ARNnc est corrélé au niveau du gène associé ce qui suggère un mécanisme de régulation commun (^{118,119}). Ceci implique que la transcription de l'ARNnc et de l'ARNm entre en compétition pour la formation du Complexe de Pré-Initiation (PIC) ou bien la transcription cryptique masque le site d'initiation de la transcription de l'ARNm. Par exemple l'ARNnc *SRGI* est transcrit en même temps que l'ARN *SER3*, il interfère ainsi avec la transcription de *SER3* (¹²⁷). Il ne s'agit pas exactement d'interférence de la transcription. En effet la présence de l'ARN polymérase II sur l'un n'empêche pas la présence de l'ARN polymérase II sur l'autre. Cependant la transcription de *SRGI* induit un repositionnement des histones au niveau du promoteur de *SER3* limitant ainsi son activité (¹²⁸). De la même manière le gène *URA2* contient un CUT dont la transcription est importante pour la régulation de ce gène (^{129,130}). Le mécanisme impliqué reste encore inconnu.

d. *Cas particulier du rétrotransposon*

La transcription pervasive à partir d'un promoteur interne situé en aval du promoteur classique a aussi été mise en évidence. C'est le cas du rétrotransposon le plus abondant chez *S. cerevisiae* : le rétrotransposon *TYI*. Ce rétrotransposon est composé de deux longues

séquences terminales répétées (Long Terminal Repeat ou LTR) qui encadrent les deux régions codantes. Ces régions codent respectivement la protéine *gag* (région *TYA*) et la protéine *pol* (région *TYB*). Le laboratoire a mis en évidence un ARN cryptique transcrit à partir du promoteur interne du retrotransposon mais en orientation antisens par rapport à l'orientation de la séquence codante (¹³¹). Cet ARNnc appelé *RTL* est capable d'entraîner une répression transcriptionnelle et post-transcriptionnelle du rétrotransposon *TY1* (^{131,132}). Cet ARNnc est insensible à l'activité de l'exosome mais est très sensible à l'activité de l'exoribonucléase *Xrn1* (¹³¹). Les ARNnc issus de la transcription divergente ne sont donc pas tous dégradés par l'exosome nucléaire. La transcription pervasive à partir de promoteurs divergents engendre des ARNnc qui sont dégradés par l'exosome nucléaire (3' vers 5') ou par la machinerie de dégradation cytoplasmique (5' vers 3'). Cependant les facteurs impliqués dans l'adressage des ARNnc vers l'une ou l'autre voie de dégradation ne sont pas connus.

e. *Orientation de la transcription bidirectionnelle*

La transcription à partir d'un même promoteur peut conduire à la production d'un ARNnc ou d'un ARNm. Des études récentes ont donc cherché les facteurs impliqués dans l'orientation de la bulle de transcription (^{133,134}). Les nucléosomes constituent un obstacle majeur pour la transcription. Ils sont positionnés au niveau des promoteurs par des modifications d'histones, des variants d'histone ou par des facteurs de remodelage de la chromatine (^{135,136}). Parmi ces facteurs, il a clairement été établi que la déacétylation des histones par le complexe histone déacétylase (Histone DéAcétylase Complex ou HDAC) *Rpd3* limite l'activation de transcription à partir de promoteurs cryptiques à l'intérieur des régions codantes (voir paragraphe suivant). De plus, *Rpd3* est impliquée dans la déacétylation de nucléosomes proches des promoteurs. Cette déacétylation limite la transcription divergente (¹³³). Les modifications post-traductionnelles des histones localisées au niveau des promoteurs jouent un rôle primordial dans l'orientation de la transcription. *Isw2*, un facteur de remodelage de la chromatine (¹³⁷), semble aussi impliqué dans ce phénomène. En effet la délétion de *ISW2* augmente la transcription divergente depuis un certain nombre de promoteur. Cette transcription devient visible dans un mutant de l'exosome. De part son activité de positionnement des histones en 5' des gènes, *Isw2* régule la transcription divergente (^{134,138}). Cependant *Isw2* est aussi impliquée dans la terminaison de la transcription et dans le positionnement des nucléosomes en 3' des gènes. Il est donc difficile de discerner un effet direct sur la transcription divergente d'un effet indirect qui passe par le contrôle de la terminaison de la transcription par *Nrd1/Nab3*.

2. Transcription pervasive depuis les régions pauvres en nucléosomes à proximité du site de terminaison de la transcription

a. Importance des facteurs de remodelage de la chromatine

Des régions contenant peu de nucléosomes ont aussi été caractérisées à l'extrémité 3' des gènes chez la levure suggérant un rôle du positionnement des nucléosomes dans la terminaison de la transcription (¹³⁹). Il a d'ailleurs été démontré que le facteur de remodelage des nucléosomes Isw1 et de la chromatine Chd1 interviennent dans le contrôle de la terminaison (¹⁴⁰). Comme citée précédemment la délétion du facteur Isw2 entraîne l'activation de la transcription cryptique en 5' ou en 3' des gènes (¹³⁸) (figure 7).

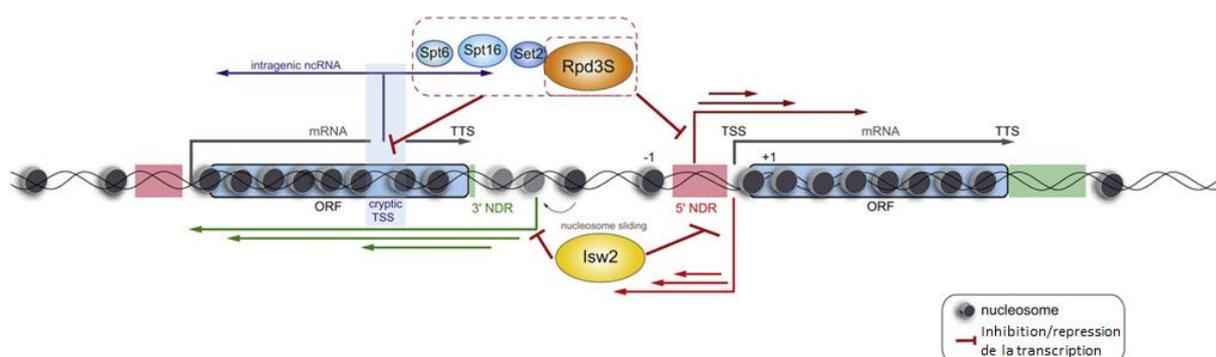


Figure 7 : Facteur de remodelage de la chromatine et transcription des ARNnc

Les facteurs de remodelages de la chromatine comme Spt6, Spt16, Set2, Rpd3S et Isw2 influent sur l'accessibilité de la chromatine et donc sur la transcription des ARNnc. Adapté de Tisseur et al, Biochimie, 2011.

Dans tous ces cas, pour rendre visible ces ARN, l'exonucléase nucléaire Rrp6 doit être déléte.

b. Nature des ARNnc impliqués

Parmi ces ARNnc antisens de gènes se trouvent certains CUT. Cependant la plupart correspond à des XUT. Environ 66% des XUT sont antisens d'un gène (¹²⁵). Tous ces ARN sont instables et normalement dégradés dans une souche sauvage. Tout comme pour les yPAR, le niveau d'expression de ces ARNnc dépend de leur synthèse qui est régulée par le positionnement des nucléosomes et de leur dégradation par l'exosome nucléaire ou par Xrn1 dans le cytoplasme. De plus pour un certain nombre de gènes il existe une anti-corrélation

entre la présence de l'ARNnc et la quantité de l'ARNm du gène correspondant. En présence de l'ARNnc la quantité d'ARNm est alors réduite. Ceci suggère que ces ARNnc ont une fonction régulatrice (^{125,141}).

Deux grands types d'ARNnc interviennent dans le contrôle de la méiose. Le premier joue un rôle dans le contrôle de la ploïdie. Des cellules haploïdes ne peuvent pas entrer en méiose. Chez *S. cerevisiae*, ce contrôle est effectué par un ARNnc. *IME1* (Inducer of MEiosis 1) code un facteur de transcription qui permet d'initier le processus de méiose (¹⁴²⁻¹⁴⁴). *IME1* est ainsi un des gènes les plus régulés chez *S. cerevisiae* (¹⁴⁵). Rme1 (Repressor of MEiosis 1) se fixe dans le promoteur de *IME1* dans des cellules haploïdes (^{146,147}). Dans des cellules diploïdes, le répresseur $\alpha 1-\alpha 2$ est produit à partir des deux loci mat différents. Ce répresseur bloque la transcription de *RME1* (^{148,149}). Dans des levures haploïdes cultivées dans un milieu de sporulation le SUT643 est très fortement stabilisé. Ce SUT, renommé *IRT1* par Van Weren et al, est localisé dans le promoteur du gène *IME1*. La transcription de *IRT1* est sous le contrôle de Rme1, elle recrute l'histone méthyl-transférase Set2 et l'histone déacétylase Set3 et augmente la densité en histone au niveau du promoteur réprimant ainsi le gène *IME1* (¹⁵⁰). Ainsi le premier inducteur étant réprimé, la méiose ne peut pas être déclenchée.

Le second type intervient dans le déclenchement de la méiose. De récents travaux ont mis en évidence de nouveaux ARNnc dans des levures diploïdes. En effet ces lignées expriment deux autres types d'ARNnc : les ARNnc associés à la respiration ou à la sporulation (respiring or sporulating associated SUT ou rsSUT) et les ARNnc associés à la méiose (Meiotic Unannotated Transcripts ou MUT) (¹⁵¹). Les rsSUT ont été identifiés dans des cellules sauvages diploïdes. Ce sont donc les équivalents des XUT des cellules haploïdes. Les MUT sont exprimés une fois le programme méiotique enclenché. Il est intéressant de noter la corrélation entre l'inactivation de Rrp6, la progression de la méiose et l'apparition des MUT. Puisque les MUT sont sensibles à Rrp6 ils pourraient appartenir à la classe des CUT. Bien que la plupart des MUT soient antisens de gènes, suggérant ainsi un rôle régulateur, aucune fonction claire n'a pu être établie pour le moment (¹⁵¹).

3. Transcription pervasive à partir des régions codantes

Nous avons vu que l'absence de nucléosomes est fondamentale pour l'initiation de la transcription. Or la transcription elle-même entraîne un déplacement des nucléosomes lors de son passage. En effet les chaperons d'histones Spt6 et Spt16 réorganisent les nucléosomes après le passage de l'ARN polymérase II (¹⁵²). Le déplacement précis de ces nucléosomes empêche l'initiation de la transcription à partir de promoteurs cryptiques. Les modifications post-traductionnelles des histones peuvent aussi être importantes pour masquer ces promoteurs cachés. En effet la perte de l'histone méthyl-transférase Set2 ou de l'histone déacétylase Rpd3 augmente l'activité des promoteurs cryptiques situés à l'intérieur de gènes (^{153,154}). Plus précisément il a été montré que le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II recrute Rpd3 au niveau des gènes transcrits. La méthylation des histones réalisée par Set2 est nécessaire à l'activité de Rpd3. En effet les sous-unités Rco1 et Eaf1 de ce complexe reconnaissent la méthylation sur H3K36 (¹⁵³⁻¹⁵⁷). Ces ARNnc ne sont pas sensibles à l'exosome. Ces ARNnc sont donc différents des CUT. De plus ceci semble indiquer que le positionnement des nucléosomes est suffisant pour contrôler complètement la synthèse de ces ARN. Cependant le rôle exact de ces transcrits n'est pas encore clairement connu tout comme les conditions physiologiques entraînant leur synthèse.

4. Transcription pervasive à partir de séquences répétées structurées

Nous avons vu que des régions pauvres en nucléosomes sont situées au début et à la fin des gènes. Elles sont aussi présentes au niveau de régions répétées comme les télomères et l'ADN codant les ARN ribosomiques.

a. ARNnc TERRA de *S. cerevisiae*

Au niveau des télomères, les nucléosomes sont remplacés par des facteurs spécifiques capables de se fixer sur la chromatine comme la protéine Rap1. Au niveau de l'ADNr les nucléosomes sont déplacés par la transcription très active effectuée par l'ARN polymérase I. Et comme pour les autres régions pauvres en nucléosomes des ARNnc y ont été identifiés (^{80,122,158}). Les ARNnc TERRA sont sensibles à l'activité exoribonucléase 5' vers 3' nucléaire de Rat1. Leur stabilisation entraîne le raccourcissement des télomères par la formation d'hybride ARN/ADN (⁸⁰).

b. ARNnc exprimés depuis les régions d'ADNr

Des ARNnc transcrits à partir de ces régions ont été identifiés. Ils sont transcrits par l'ARN polymérase II à partir de la région IGS1-R (InterGenic Spacer Region). Ils sont sensibles à l'activité de l'exosome (^{122,158}). Les facteurs impliqués dans l'expression de ces ARNnc pourraient réguler la recombinaison homologue entre régions répétées pendant la réplication. Ceci permet de contrôler le nombre de copie des séquences répétées.

5. Transcription pervasive contrôlée par des facteurs de transcription

Bien que les exemples d'ARNnc cités jusqu'à présent soient transcrits à partir de régions pauvres en nucléosomes, certains ARNnc sont transcrits grâce à des facteurs de transcription spécifiques. Jusqu'à présent trois exemples sont connus.

a. Cas de RME2

Le premier exemple est l'ARNnc antisens appelé *RME2* (Repressor of MEiosis). La transcription est sous le contrôle du répresseur $\alpha 1-\alpha 2$. Ce répresseur n'est présent que dans les cellules diploïdes. Dans des cellules haploïdes *RME2* est donc exprimé et réprime par interférence transcriptionnelle le gène *IME4* (^{159,160}). Dans des cellules diploïdes le répresseur $\alpha 1-\alpha 2$ réprime *RME2* entraînant la dérégulation de *IME4*.

b. Cas de GALucut

Le second exemple est l'ARNnc appelé *GALucut*. Cet ARNnc est rencontré au niveau du locus *GALI-10*. Cet ARNnc est antisens de l'ARNm de *GAL10* (^{161,162}). L'expression de cet ARNnc contrôle la cinétique d'induction de *GALI* grâce à la di et tri-méthylation en H3K4 déposée par l'histone méthyl-transférase Set1 (¹⁶²). La transcription de cet ARNnc est dépendante du facteur de transcription Reb1. Ce facteur permet la synthèse de cet ARNnc uniquement en milieu contenant du glucose (figure 8).

c. Cas de ICR1 et PWR1

Le troisième exemple concerne le gène *FLO11*. Son expression est contrôlée par deux ARNnc *ICR1* et *PWR1* (¹⁶³). La transcription de *ICR1* interfère avec le promoteur de *FLO11*, elle est sous le contrôle du facteur de transcription Sfl1. Au contraire *PWR1* interfère avec la transcription de *ICR1*, sa transcription est sous le contrôle du facteur de transcription

Flo8. Lorsque *PWR1* est exprimé, la transcription de *ICR1* est réprimée ce qui dérèprime le gène *FLO11* (¹⁶³) (figure 8).

Puisque ces ARNnc sont synthétisés grâce à des facteurs de transcription précis ils pourraient être considérés comme étant transcrits à partir de gènes. En effet la définition la plus large d'un gène est une séquence d'ADN qui conduit à la production d'un ARN fonctionnel. De manière générale, cette notion a récemment été élargie à tous les ARNnc dont la fonction a été établie.

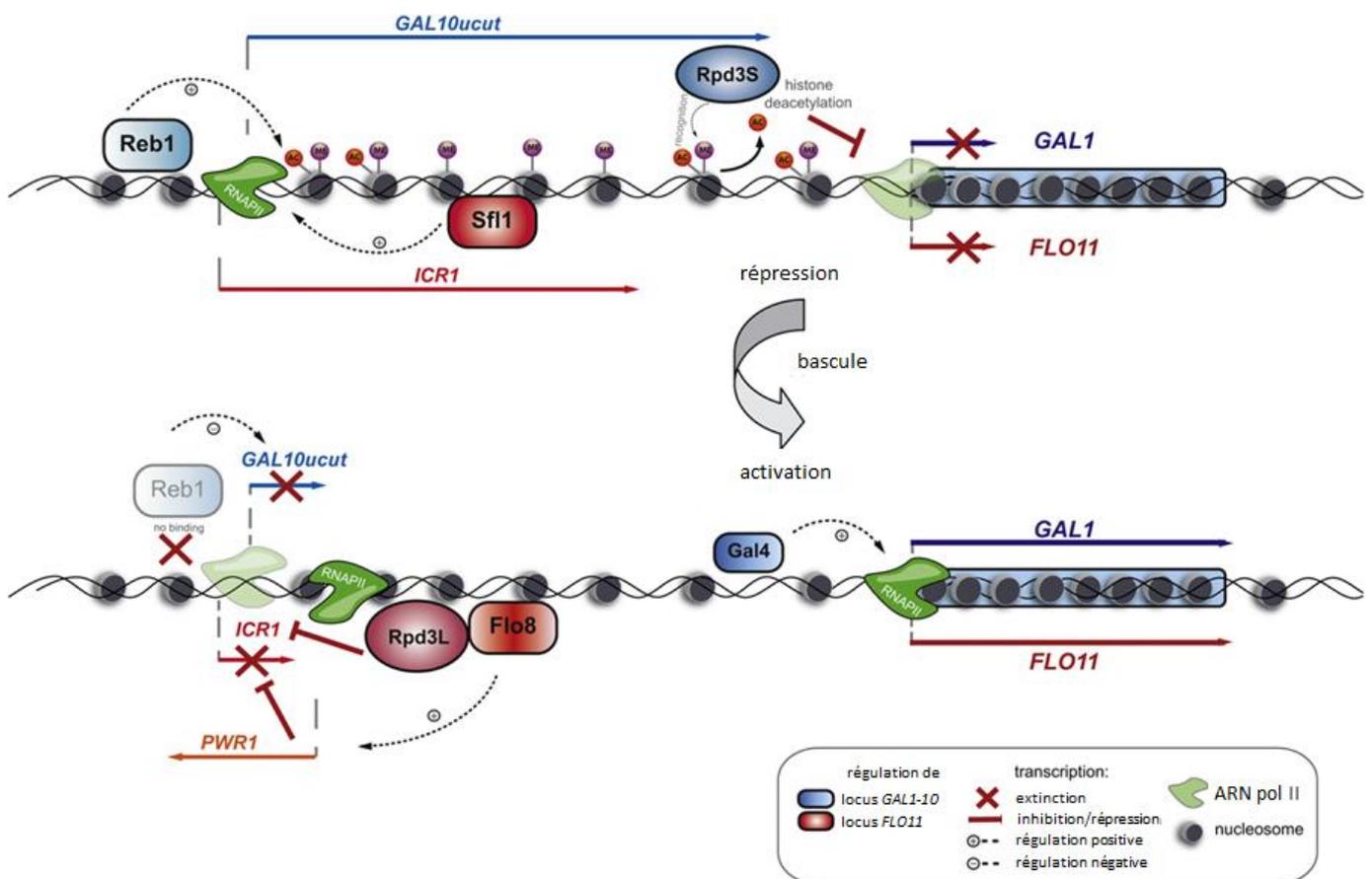


Figure 8 : Mode de régulation des loci *GAL1-10* et *FLO11*

En conditions de répression, la transcription de l'ARNnc *GAL10ucut* est induite par le facteur Reb1. Cette transcription induit la méthylation des histones au niveau du promoteur de *GAL1* par Set2, ce qui entraîne le recrutement de Rpd3 qui déacétyle le promoteur de *GAL1* provoquant ainsi la répression du gène. En conditions d'activation, l'ARNnc n'est plus transcrit et le promoteur ne subit plus de modifications, le gène *GAL1* est transcrit.

En conditions de répression le facteur de répression Sfl1 induit la transcription de l'ARNnc *ICR1*. Cette transcription bloque la transcription de *PWR1* qui conduit à une inhibition de *FLO11*. En conditions d'activation Flo8 induit la transcription de *PWR1* qui bloque la transcription de *ICR1* ce qui permet la transcription de *FLO11*. Adapté de Tisseur et al, Biochimie, 2011.

. *Les ARNnc procaryotes*

Les Procaryotes doivent continuellement faire face à des variations du milieu extérieur que ce soit en terme d'accessibilité à une source de carbone, d'azote ou de métaux. Ils doivent aussi pouvoir lutter contre d'autres micro-organismes pour leur propre survie. Pour répondre rapidement à ces variations les Procaryotes ont développé tout un système de régulation à base d'ARNnc. Nous verrons tout d'abord comment et quand ces ARNnc sont synthétisés, quel est leur mode d'action et nous verrons ensuite comment ces ARNnc peuvent réguler la pathogénicité d'un micro-organisme.

I. Synthèse

Afin de mettre en évidence les conditions particulières d'expression des ARNnc procaryotes nous allons voir plusieurs exemples qui permettront de dégager des caractéristiques générales.

1. L'ARN 6S

L'ARN polymérase bactérienne est composée de 5 sous-unités : 2 sous-unités α , une sous-unité β , une sous-unité β' et la sous-unité σ . C'est la sous-unité σ qui fait la spécificité des gènes transcrits. Il existe plusieurs sous-unités σ qui ne reconnaissent pas toutes le même promoteur. En changeant de sous-unité σ un procaryote peut donc totalement modifier son transcriptome. La sous-unité majeure chez *Escherichia coli* est la sous-unité $\sigma 70$ (^{164,165}).

La synthèse de l'ARN 6S est continue lors de la croissance bactérienne. Il s'accumule au cours de la croissance pour atteindre son niveau maximum en phase stationnaire. Dans ces conditions entre 80 et 90% de la sous-unité $\sigma 70$ est piégé par cet ARN (figure 9). De manière surprenante, lorsque la concentration en nucléotides augmente l'ARN 6S est utilisé comme substrat pour la transcription grâce à la sous-unité $\sigma 70$. Un ARN de 14 à 20 nucléotides appelé pRNA est ainsi synthétisé ce qui a constitué le premier exemple de transcription d'un ARN à partir d'un ARN (¹⁶⁶). La transcription de cet ARN entraîne la dissociation du complexe $\sigma 70$ /ARN 6S (¹⁶⁶⁻¹⁷²). De plus pARN reste alors fixé à l'ARN 6S qui ne peut plus piéger $\sigma 70$ (¹⁷⁰). Cette interaction entre ARNnc qui piège un autre ARNnc rappelle linc-MD1 et BACE1-AS des eucaryotes.

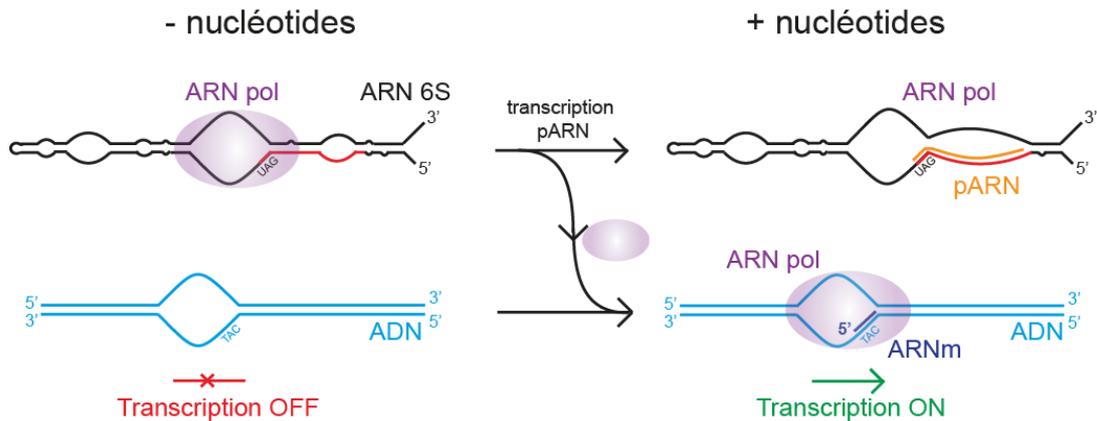


Figure 9 : ARN 6S et modification de l'activité de $\sigma 70$

La structure de l'ARN 6S ressemble à un promoteur ouvert. Il peut donc piéger la sous unité de l'ARN polymérase $\sigma 70$ en absence de nucléotides dans le milieu. Ceci entraîne l'extinction de la transcription de nombreux gènes. Certains gènes ne sont pas éteints, d'autres gènes sont transcrits. L'interaction de $\sigma 70$ avec l'ARN modifie donc son activité. En présence de nucléotides dans le milieu, pARN est produit à partir de la transcription de l'ARN 6S. Cette transcription induit la séparation de l'ARN 6S et de $\sigma 70$. Le complexe pARN/ARN 6S est ensuite dégradé.

2. Système à deux composantes et ANRnc

Le système à deux composantes est un système connu chez un très grand nombre de bactéries. Brièvement il est composé d'un senseur capable de « sentir » les variations d'un paramètre physique ou chimique et d'un effecteur. Ce système permet aux bactéries de réagir rapidement aux variations du milieu extérieur. Plusieurs exemples de système à 2 composantes faisant intervenir des ARNnc sont connus. Par exemple les ARNnc CsrB (369nt) et CsrC (242nt) sont impliqués dans la régulation du métabolisme du carbone chez *E. coli*. Dans ce système la protéine CsrA active le système à 2 composantes BarA/UvrY où BarA est le senseur et UvrY l'effecteur. Ceci entraîne la stimulation de la synthèse de CsrB et CsrC (^{173,174}). Ce système est aussi présent chez *Erwinia caratovora*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* et *Pseudomonas fluorescens* (¹⁷⁴). Dans le cas du métabolisme du glucose, la transcription de l'ARNnc SgrS (227nt) est induite par les protéines SgrR et Mlc. SrgR est codée par un gène divergent de la région codant SrgS. SrgR active la transcription de SrgS en présence de Glucose-6-Phosphate (G6P). Mlc réprime SrgS indépendamment de SrgR (^{175,176}). Chez *Bacillus subtilis*, l'ARNnc SR1 (205nt) intervient dans le métabolisme de l'arginine. Sa synthèse est induite lors de l'entrée en phase stationnaire et est réprimée quand des sucres sont utilisés comme source de carbone (¹⁷⁷) De plus la L-arginine stimule la

transcription de SR1 (^{178,179}). Chez *E. coli*, en présence de fer la transcription de l'ARNnc RyhB (90nt) est réprimée par le facteur Fur qui est une protéine impliquée dans la régulation du métabolisme du fer (¹⁸⁰). RyhB est aussi présent chez *P. Aeruginosa*, mais aussi dans des espèces de *Neisseria*, *Vibrio* et *Shigella* (¹⁸¹). Chez *E. coli* le contrôle de l'intégrité de l'enveloppe passe aussi par des ARNnc. Le facteur de transcription σE est séquestré au niveau membranaire par la protéine membranaire RseA. Le mauvais repliement de protéines membranaires entraîne la protéolyse de RseA (¹⁸²). Cette protéolyse libère le facteur σE qui peut alors transcrire les gènes cibles (¹⁸³) parmi lesquels se trouvent l'ARNnc RseX, MicA et RyhB (¹⁸⁴).

Ces exemples montrent tous que ces ANRnc sont produits suite à un signal spécifique même si tous les facteurs impliqués dans leur transcription ne sont pas encore connus. Il est intéressant de noter que la synthèse d'ARN est plus rapide et moins coûteuse en énergie que la synthèse de protéines (¹⁸⁵). Ces ARN permettent aussi des régulations plus fines des gènes concernés en complément de la régulation par des facteurs de transcription (^{186,187}). L'utilisation d'ARNnc permet donc de réagir très rapidement à des variations du milieu expliquant ainsi la vitesse à laquelle les procaryotes s'adaptent aux changements de leur environnement. Pour le moment nous nous sommes seulement intéressés au mode de synthèse de ces ARNnc. Nous allons maintenant voir comment ces ARN peuvent être des ARN régulateurs.

II. Mode d'action

Basiquement un ARN peut interagir avec un autre ARN et former un ARNdb, avec une protéine ou avec de l'ADN et former un hybride ARN/ADN. Nous allons maintenant voir en quoi ces interactions peuvent réguler l'expression de gènes.

1. ARNdb

Nous avons déjà vu qu'un ARN pouvait se plier et former un ARNdb (cf ARN 6S). Mais beaucoup de structures en ARNdb proviennent de l'interaction de 2 molécules d'ARN différentes. Ces molécules ne sont pas forcément complètement antisens l'une de l'autre. La formation de ces structures peut faire intervenir des interactions non-canoniques (G-U) et même former des bulles laissant l'ARN sous forme simple brin. Lorsque l'ARNnc est déjà bien structuré les parties sous forme simple brin peuvent plus facilement interagir avec d'autres ARN. C'est le cas pour l'interaction de RNAlIII avec les ARNm de sa1000, spa et rot

chez *Staphylococcus aureus* (¹⁸⁸). L'interaction entre 2 ARN est très efficace. En effet peu de nucléotides sont requis afin de former un ARNdb. Par exemple 9nt sont nécessaires à l'interaction de RyhB et l'ARNm de *sodB* chez *E. coli* (¹⁸⁹). 6 nucléotides seulement sont requis pour que SrgS et ptsG forment un double brin (¹⁹⁰). Ceci permet donc à un ARNnc d'avoir plus d'une cible et donc de réguler plusieurs gènes en même temps. Chez *E. coli* une protéine facilite la formation d'ARN double brin. Il s'agit de la protéine Hfq. En effet cette protéine possède une haute affinité pour l'ARN *in vitro* et favorise dans un grand nombre de cas l'interaction entre l'ARNnc et sa ou ses cibles (¹⁸⁴). Toutefois il semble que chez *E. coli* les ARNnc produits au même locus que l'ARNm qu'ils ciblent n'aient pas besoin de Hfq (¹⁹¹). De plus beaucoup d'espèces de bactéries ne possèdent pas d'homologues connus de Hfq alors que des ARNdb y ont été identifiés. Hfq n'est donc pas un élément indispensable à la formation d'ARNdb dans beaucoup de cas. De plus l'implication de Hfq ne prédit en rien la localisation de l'interaction au niveau de l'ARNm. Cette interaction peut avoir lieu dans la région non traduite en 5' de l'ARN, dans la région codante ou dans la région non traduite en 3' de l'ARN (figure 10).

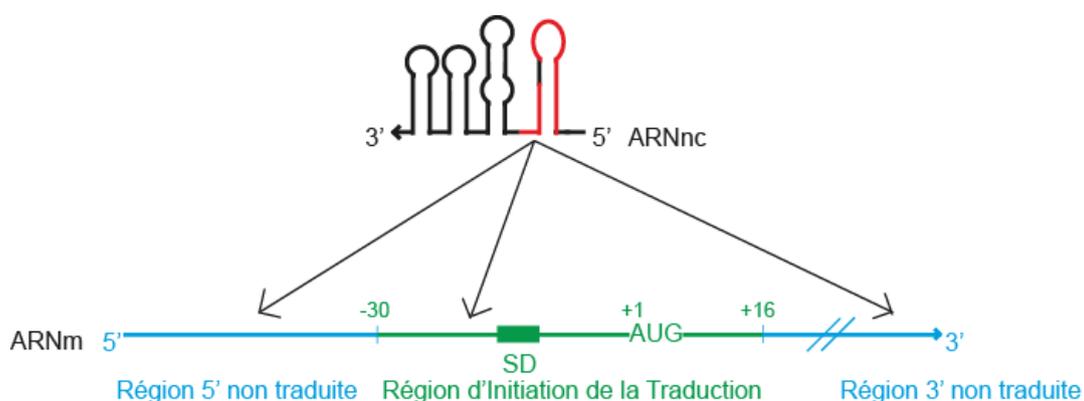


Figure 10 : Zone d'interaction entre un ARNnc et un ARNm

Un ARNnc procaryote peut s'hybrider partiellement ou complètement avec un ARNm au niveau de la région 5' non traduite, de la région codante ou de la région 3' non traduite et avoir des conséquences sur la transcription, la traduction ou la stabilité de l'ARNm. Adapté de Darfeuille et al, 2007.

2. Interaction avec la région 5' non traduite

La majorité des ARNnc connus aujourd'hui interagissent avec la région 5' UTR (table 1). Nous ne prendrons ici que quelques exemples afin de voir les conséquences d'une telle interaction. Le premier exemple est celui de SrgS qui intervient dans le métabolisme du glucose. Cet ARNnc interagit avec la région 5'UTR du l'ARNm de ptsG au niveau du site de

reconnaissance du ribosome. Cette interaction empêche la fixation du ribosome sur l'ARNm induisant ainsi l'inhibition de la traduction de l'ARN ptsG^(192,193). L'interaction avec la région de fixation du ribosome induit systématiquement une inhibition de la traduction du gène concerné. Un ARNnc peut aussi interagir dans la région 5'UTR mais en dehors de la séquence reconnue par le ribosome. Chez *E. coli*, l'ARNnc DsrA interagit avec l'ARNm de rpoS dans cette région. Cette interaction induit une activation de la transcription⁽¹⁹⁴⁾. Toujours chez le même organisme l'ARNnc SymR (77nt) interagit avec la région 5' non traduite de l'ARNm SymE en dehors de la région Shine et Dalgarno mais dans ce cas la traduction de l'ARN est inhibée⁽¹⁹⁵⁾. C'est aussi le cas pour l'ARN CsrA⁽¹⁹⁶⁻¹⁹⁸⁾ L'interaction avec ce type de région peut donc induire une activation ou une répression de la traduction de l'ARNm concerné (figure 11).

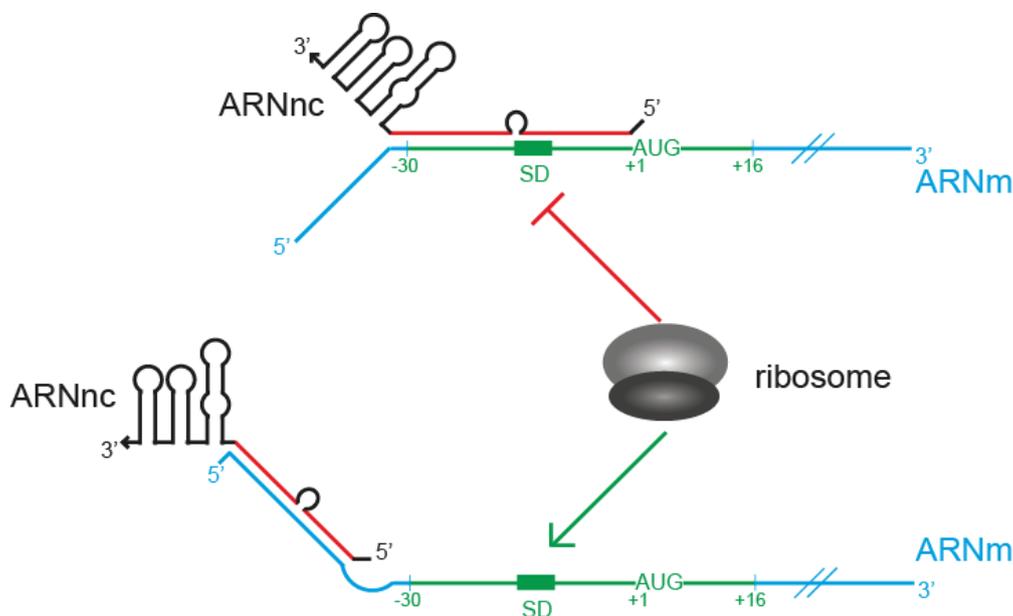


Figure 11 : Effet de l'interaction d'un ARNnc sur la région 5' non traduite

Une interaction entre un ARNnc et son ARNm cible dans la région 5' non traduite peut masquer le site d'initiation de la traduction (Séquence Shine et Dalgarno = SD) et bloquer la traduction pour le panel du haut ou bien démasquer la séquence SD et favoriser la traduction pour le panel du bas. Adapté de Repoila et Darfeuille, Biol Cell, 2009.

Plusieurs plasmides expriment des ARNnc capables d'interagir avec des ARN en cours de synthèse et causer une terminaison précoce de la transcription. C'est le cas des plasmides pT181 de *S. aureus*^(199,200) et pIP501 de *Bacillus subtilis*⁽²⁰¹⁾. Dans ces deux cas

l'ARNnc est capable d'interagir avec l'ARNm *repA* en cours de synthèse. Ce gène code une protéine impliquée dans l'initiation de la réplication du plasmide. Cette interaction conduit à la formation d'une structure terminatrice de transcription dans la séquence leader de l'ARNm (^{191,200-205}) (figure 12). L'élongation est ainsi bloquée. Bien qu'il n'existe pas de vraies histones chez les bactéries, il existe tout de même chez ces organismes des ARNnc qui ont un effet transcriptionnel, constituant ainsi un nouvel exemple de convergence évolutive.

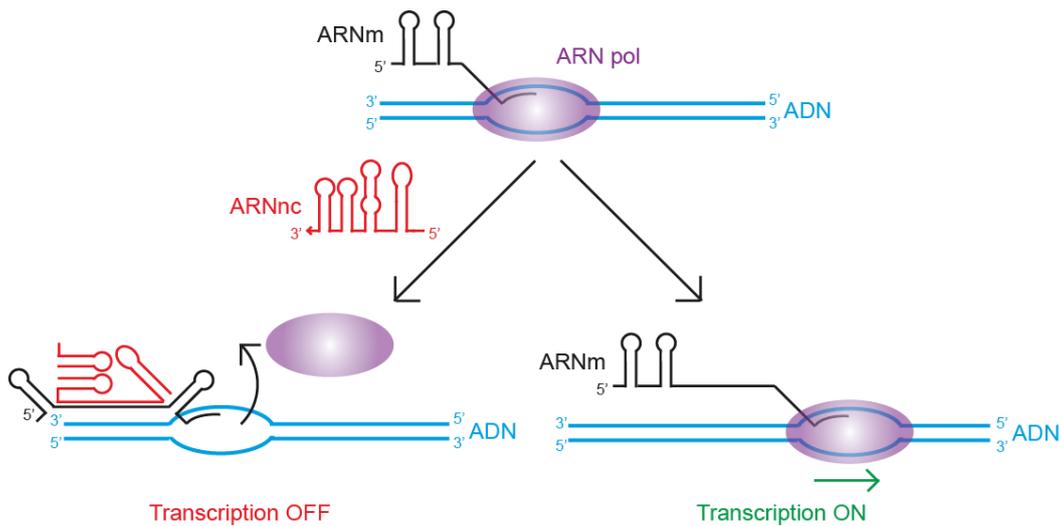


Figure 12 : ARNnc et atténuation de transcription

Un ARNnc peut interagir avec un ARN en cours de synthèse. Cette interaction peut entraîner la formation d'une structure en tige boucle semblable à un signal de terminaison de la transcription. Ce phénomène conduit à une diminution de la transcription complète du gène considéré.

3. Interaction avec la région codante

Contrairement aux interactions avec les régions non codantes, les interactions entre un ARNnc et la région codante d'un ARNm sont rares. L'exemple le mieux connu est celui de SR1 de *B. subtilis*. Cet ARN interagit avec la région codante de l'ARNm de *ahrC*. Ceci induit un changement de conformation de l'ARNm qui masque la séquence SD. La traduction de l'ARNm correspondant est ainsi inhibée (¹⁷⁹). Le principe est le même que pour Uchl1-AS chez les Eucaryotes.

4. Interaction avec la région 3' UTR

La troisième possibilité d'interaction entre un ARNnc et un ARNm est l'interaction au niveau de la région 3' non traduite. Contrairement à l'interaction avec la région 5' non traduite cette interaction n'influe pas sur la traduction de l'ARNm. Elle modifie la stabilité de l'ARNm. C'est le cas de l'ARNnc RatA (222nt) chez *B. subtilis*. Le gène *ratA* et le gène *txpA* qu'il régule sont convergents. Ainsi les régions 3' non traduites sont donc parfaitement complémentaires. L'ARNdb ainsi formé est un substrat de dégradation⁽²⁰⁶⁾. Chez *E. coli* l'ARNnc GadY (trois isoformes : 105nt, 90nt et 59nt) interagit avec la région 3' non codante de GadX entraînant son accumulation^(207,208). Ce genre d'interaction peut donc selon les cas conduire à une stabilisation ou à une déstabilisation de l'ARN cible. Ceci montre bien qu'il existe un lien fort entre ARNnc et stabilité des ARN cibles. En effet la majorité des procaryotes possèdent des RNase susceptibles de digérer des ARNdb : la RNase III et la RNase E.

5. ARNdb et RNase

La RNase III est une enzyme qui a pour substrat des duplex d'ARN d'au moins deux tours d'hélices mais peut aussi parfois avoir d'autres cibles⁽²⁰⁹⁻²¹¹⁾. Des duplex parfaits peuvent être formés lorsque l'ARNnc est antisens. C'est le cas pour RldD/ldrD, Rat/txpA et IsiR/isiA dont les duplex sont digérés par la RNase III. Bien que IstR-1/tisB et RNAIII/spa ne forment pas un duplex parfait ils sont quand même la cible de la RNase III. L'autre RNase susceptible de dégrader des ARNdb est la RNase E. Cet enzyme appartient au dégradosome. Le dégradosome est composé de RNase E, d'une polynucléotide phosphorylase 3'-5' (PNPase) et d'une hélicase ARN (RhlB). L'extrémité C-terminale de la RNase E est nécessaire à la formation de ce complexe^(212,213). Contrairement à la RNase III, la RNase E ne peut cliver que les parties des ARN qui ne sont pas prises dans des structures secondaires. Les fragments ARN ainsi produits sont ensuite phosphorylés par la PNPase. L'hélicase RhlB permet de déplier les ARN afin qu'ils soient de bons substrats pour la PNPase⁽²¹⁴⁾. RNase E est aussi capable d'interagir avec Hfq, la protéine qui facilite la formation d'ARNdb. Les ARNdb formés grâce à Hfq peuvent donc être directement dirigés vers le dégradosome pour y être digérés. C'est le cas de RyhB qui cible la dégradation d'au moins 18 transcrits⁽¹⁸⁹⁾. C'est aussi le cas pour les ARNnc SgrS⁽¹⁹⁰⁾, RybB⁽²¹⁵⁾, OmrA, et OmrB⁽²¹⁶⁾. Même si cela n'a pas encore été vérifié il est raisonnable de penser que les ARNdb formés grâce à Hfq ont de fortes chances d'être un substrat du dégradosome. Il existe donc plusieurs voies permettant la

dégradation de duplex d'ARN qui permettent la régulation de l'expression de gènes. Mais il existe aussi des cas où un clivage d'un ARN augmente sa stabilité. Chez *Clostridium perfringens*, l'interaction entre l'ARNnc VR-RNA avec un ARN codant une collagénase provoque le clivage d'une structure en tige-boucle présente dans l'extrémité 5' de cet ARNm. Ce clivage permet non seulement de révéler un site de reconnaissance du ribosome mais aussi de stabiliser l'ARNm (²¹⁷). Il arrive aussi que la formation d'ARNdb protège de la dégradation par des endonucléases : chez *Streptococcus* FasX se fixe sur l'extrémité 5' de l'ARN cible empêchant ainsi sa dégradation. De manière, générale le lien entre Hfq, Rnase E et ARNnc a été très largement étudié, en particulier par le groupe de Carpousis (^{214,218-226}). Il est donc évident que les ARNnc procaryotes influent sur la stabilité des ARNm cibles en augmentant ou diminuant leur stabilité (figure 13). Ceci rappelle étrangement les exemples de 1/2 – sbs ARN et de BACE1-AS de l'Homme.

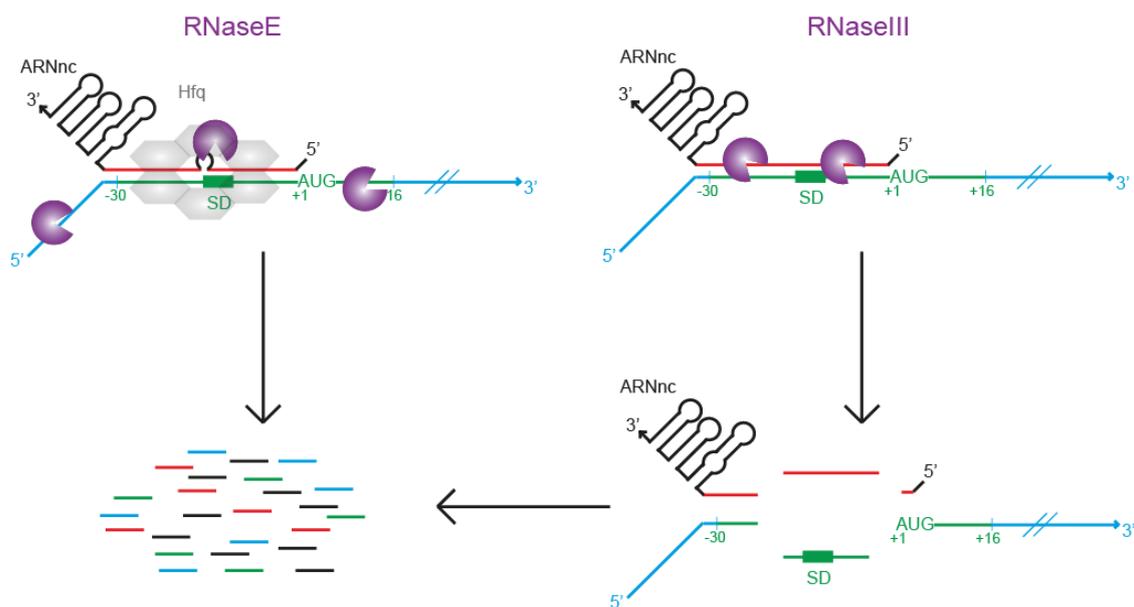


Figure 13 : ARN double brin et dégradation

La formation d'un ARN double brin est facilitée par l'action de Hfq. L'ARNdb est le plus souvent digéré par coupure endonucléolytique au niveau des régions simple-brin et double-brin par la RNase E (panel de gauche). En cas d'hybridation parfaite pour des ARN antisens la partie ARN double brin est digérée par la RNase III (panel de droite). Les ARN ainsi générés sont dégradés par le dégradosome. Adapté de Repoila et Darfeuille, Biol Cell, 2009

Mais il existe aussi des exemples où des ARNnc doivent être maturés par des endonucléases et/ou exonucléases afin d'être efficaces. C'est le cas de l'ARN 6S qui subit des coupures endonucléolytiques en 5' effectuées par les enzymes RNase E et G. Il subit aussi une dégradation aux extrémités 5' et 3' par une exonucléase (²²⁷).

Tous ces exemples montrent que, bien que ne disposant pas de machinerie d'ARN interférence les procaryotes ont développé des systèmes similaires influant sur la transcription, l'efficacité de traduction et la stabilité des ARNm comme chez les eucaryotes.

III. Interaction ARN/protéine

Les interactions ARN/protéines peuvent avoir plusieurs conséquences sur l'activité des protéines (figure 14).

1. Séquestration de protéines

Les ARNnc peuvent interagir avec des protéines en mimant la structure de l'ARN normalement ciblé par cette protéine. C'est le cas de l'ARNnc CsrB. Cet ARN possède 18 sites reconnus par la protéine CsrA, protéine connue pour réguler la stabilité et la traduction des ARN ciblés (¹⁷³). CsrB entre donc en compétition avec les ARN qui sont normalement la cible de CsrA. La présence des 18 sites de reconnaissance sur CsrB permet donc de séquestrer CsrA quand l'ARNnc est produit. Cet exemple de séquestration de protéine n'est pas un cas isolé. En effet l'ARNnc CrcA possède 5 répétitions d'un domaine reconnu par la protéine Crc chez *Pseudomonas* (²²⁸⁻²³³). Cette protéine est un répresseur traductionnel. La production de l'ARNnc CrcZ permet donc la transcription des ARN dont la traduction est normalement réprimée par la protéine Crc. De plus l'ARNnc CsrB est retrouvé dans un grand nombre de bactéries et il n'est pas rare que sa présence soit associée à l'existence d'une protéine proche de CsrA (²³⁴). Cependant le rôle des ARNnc de type CsrB ne semble pas se limiter simplement à une séquestration de protéines. En effet certaines bactéries ont plusieurs ARNnc de type CsrB et plusieurs protéines de type CsrA ce qui multiplie les interactions potentielles (²³⁵). Les ARNnc de type CsrB peuvent être détachés de CsrA par la protéine CsrD. Cette protéine est un adaptateur pour la RNase E qui dégrade CsrB (²³⁶). Des interactions ARN/protéines sont aussi présentes chez les eucaryotes avec par exemple l'ARNnc Gas5, PANDA et MALAT1.

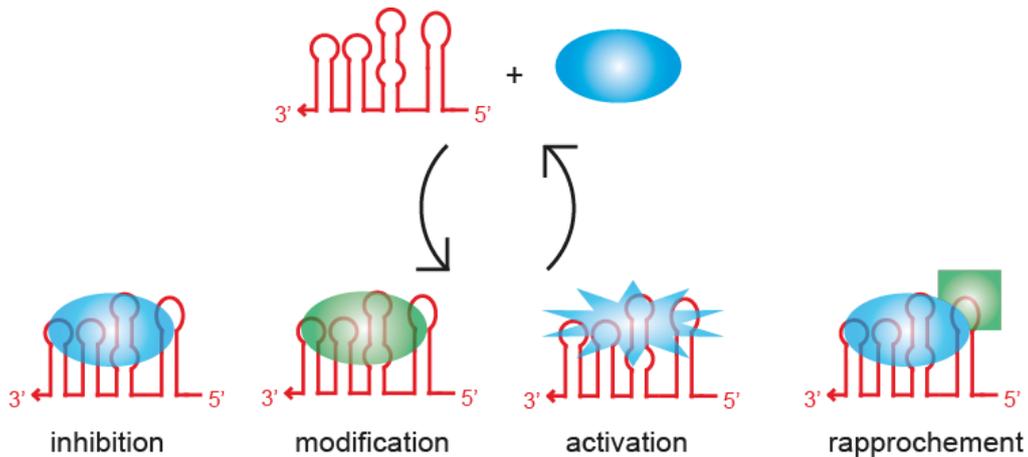


Figure 14 : ARNnc et interaction avec des protéines

L'interaction d'un ARNnc avec des protéines peut avoir différentes conséquences. Un ARNnc peut inhiber l'action d'une protéine, modifier l'action d'une protéine (voir le cas de l'ARN 6S), activer une protéine, ou permettre le rapprochement de 2 protéines. Voir le texte pour les exemples. Adapté de Storz et al, Mol Cell, 2011.

2. Régulation de l'activité catalytique

Certains ARNnc sont capables d'interagir avec des enzymes. Cette interaction permet d'activer, inhiber ou modifier l'activité de l'enzyme. C'est le cas de l'ARNnc 6S de *E. coli*. L'ARNnc 6S (ou SsrS) est un ARN de 184nt très structuré. Il est formé d'une grande partie sous forme d'ARNdb et d'une grande bulle (²³⁷⁻²³⁹). Sa structure est essentielle pour sa fonction. En effet la structure en bulle ressemble à un promoteur en fusion (figure 9). Cette structure est reconnue par le facteur $\sigma 70$ qui est ainsi piégé quand l'ARN 6S est exprimé (²³⁷). Ceci inhibe la transcription d'un grand nombre mais pas de la totalité des gènes dépendants du facteur $\sigma 70$ et permet de définir l'ensemble des gènes dont la transcription est contrôlée par l'ARN 6S (^{238,240}). Cependant les effets de l'ARNnc 6S ne semblent pas être les mêmes selon les gènes considérés. En effet tous les gènes dépendants de $\sigma 70$ ne sont pas tous affectés de la même manière : certains gènes ne sont plus transcrits alors que d'autres le sont toujours (^{241,242}). Cet ARNnc semble donc plus jouer le rôle de modificateur que de vrai inhibiteur. De plus certaines espèces comme *Bacillus subtilis* et *Legionella pneumophila* produisent 2 ARNnc 6S. Ces deux ARNnc n'ont pas exactement le même rôle puisque leur expression n'a pas le même effet sur les mêmes gènes (²⁴³⁻²⁴⁵). En outre, bien que 6S ait un effet sur un très grand nombre de gènes chez *E. coli*, seuls quelques gènes sont affectés pour un des ARNnc 6S chez *L. pneumophila* (^{241,242,245}). La dissociation de 6S du facteur $\sigma 70$ fait suite à la

transcription de 6S qui donne l'ARNnc nommé pRNA. Ces deux ARNnc forment un complexe qui est dégradé (^{166,246}). 6S est donc directement impliqué dans la synthèse de son propre répresseur. Le facteur $\sigma 70$ est de nouveau libre et les gènes dont la transcription est dépendante $\sigma 70$ sont de nouveau transcrits (²⁴⁷).

IV. Interaction avec l'ADN

Les ARNnc CRISPR sont largement présents chez les bactéries et les archées (²⁴⁸⁻²⁵⁰). Le mode d'action de ces ARNnc est particulièrement intéressant puisqu'il est très proche des voies d'ARN interférence des Eucaryotes (^{249,251,252}). Les loci CRISPR sont formés d'une séquence de tête et d'une série de répétitions séparées par des « spacers » et des gènes associés au CRISPR. Ce nombre de répétitions peut aller de 2 à 249. La taille des séquences répétées varie entre 24 et 47 paires de bases (²⁵³) (figure 15). La taille des « spacers » est comprise entre 26 et 72 paires de bases. Il est intéressant de noter que bien que les séquences des « spacers » ne soient pas conservées elles correspondent toujours à des séquences de phages ou de plasmides (²⁵³). Des analyses bio-informatiques ont suggéré que les gènes présents coderaient des protéines contenant des motifs de liaison de l'ARN ou de l'ADN ainsi que des hélicases et des ribonucléases ce qui a ensuite été confirmé *in vivo* (²⁵⁴). La transcription des loci CRISPR permet la synthèse d'un long ARN rapidement coupé en petits ARNnc. Chez *E. coli* la protéine CasE est responsable de ces coupures (²⁵⁵), il s'agit de Cas6

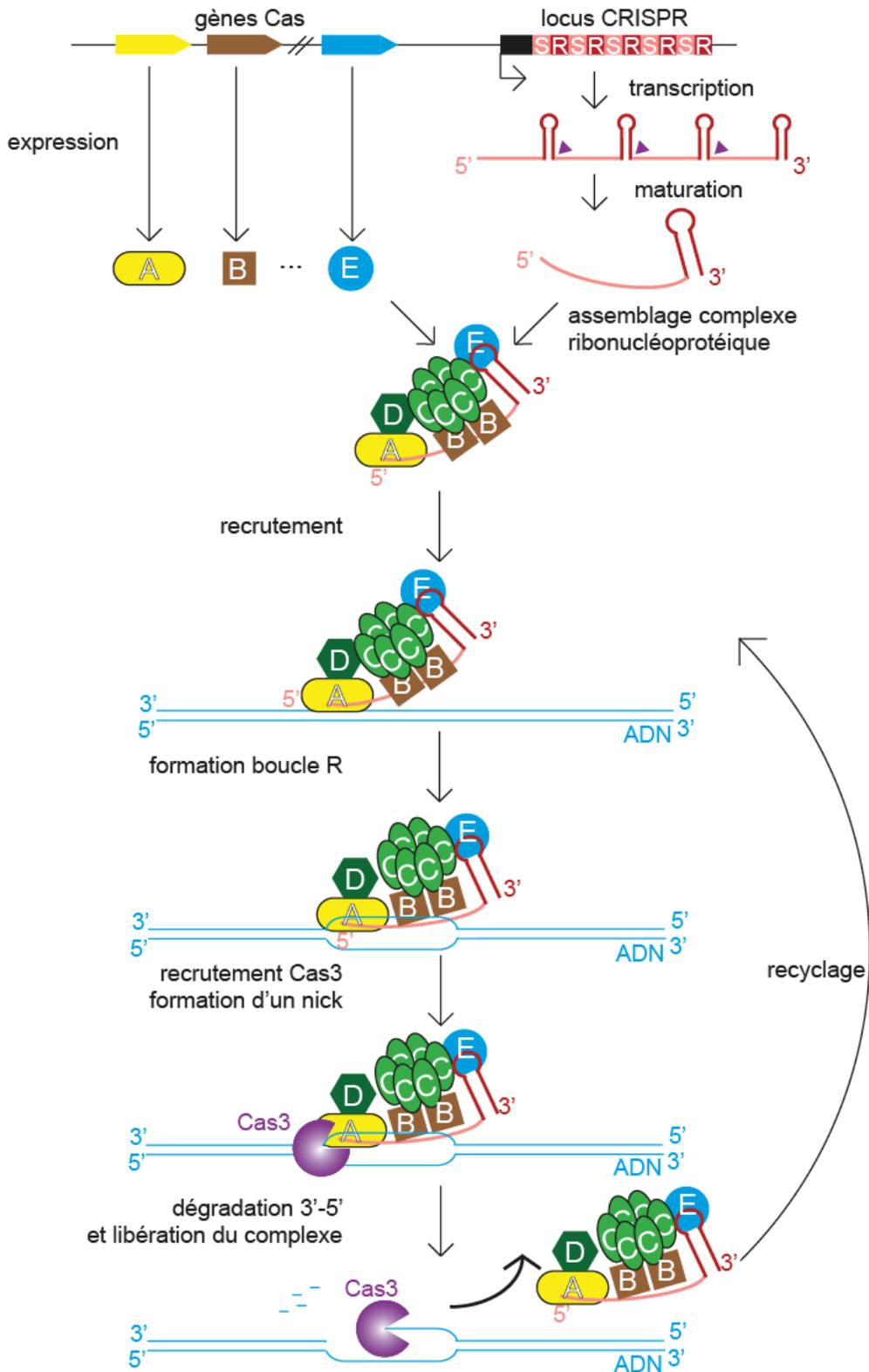


Figure 15 : CRISPR et reconnaissance de l'ADN du soi

Des ARN sont transcrits à partir des loci CRISPR constitués de spacers (S) et de séquences répétées (R). Les ARN produits sont maturés en crARN qui forment un complexe avec les protéines CasA, CasB, CasC, CasD et CasE. Ce complexe est recruté sur l'ADN complémentaire du crARN. La formation d'une boucle R induit le recrutement de Cas3 qui digère l'ADN de la boucle R. Le complexe est ensuite libéré et l'ADN simple brin détruit ou intégré dans un locus CRISPR. Adapté de Ivančić-Baće et al, J. Mol Biol, 2012.

chez *Pyrococcus furiosus* (^{256,257}). Ces coupures effectuées par des protéines du complexe Cascade permettent la formation d'ARNnc appelés repeat-spacer unit RNA (crRNA) (^{255,258}). Les protéines du complexe Cascade seraient aussi impliquées dans la reconnaissance des cibles des crRNA (²⁵⁸) jouant ici les mêmes rôles que les protéines Argonautes chez les Eucaryotes supérieurs. Les cibles de ces crARN sont les séquences d'ADN correspondant à des plasmides ou à des phages. Récemment il a été mis en évidence que ces crARN forment des boucles-R (²⁵⁹). La formation de ces boucles-R entraîne le recrutement de Cas3 qui digère l'ADN de la boucle-R (^{259,260}). L'ADN simple brin ainsi formé peut être éliminé ou intégré dans des loci CRISPR par un mécanisme qui pourrait être semblable à celui de la recombinaison de changement de classe dans les lymphocytes (²⁵⁹). Il se pourrait aussi que ces crARN soient impliqués dans le ciblage du site d'intégration des phages ou des plasmides au niveau des loci CRISPR (²⁵⁸).

Que ce soient les procaryotes ou les eucaryotes tous les organismes vivants semblent avoir développés des mécanismes de régulation impliquant des ARNnc. Même si les mécanismes précis impliquant les ARNnc sont différents entre les Procaryotes et les Eucaryotes certaines stratégies sont communes. En effet tous les êtres vivants semblent avoir développé des systèmes impliquant des interactions ARNnc/ARN, ARNnc/ protéines, ARNnc/ADN. Ces interactions peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur la transcription, la traduction ou la stabilité des ARNm. Ces éléments sont donc indispensables à la régulation de l'expression des gènes. De plus en plus de maladies et notamment de cancers sont associés à des ARNnc (²⁶¹⁻²⁶⁹). Puisque *Saccharomyces cerevisiae* ne possède pas de machinerie d'ARN interférence tout comme les bactéries mais contient de la chromatine comme les eucaryotes, cet organisme est un modèle unique pour étudier les différents mécanismes impliquant les longs ARNnc régulateurs.

. *Modification d'histones et ARNnc régulateurs*

Les effets des différents ARNnc que nous avons pu voir peuvent impliquer des modifications épigénétiques comme des modifications post-traductionnelles des histones. Nous allons voir dans un premier temps la structure de la chromatine puis dans un second temps les effets des ARNnc sur la chromatine.

I. Chromatine, histone et modifications post-traductionnelles

1. Chromatine et compaction

L'ADN est compacté autour d'octamères d'histones composés de 2 histones H2A, H2B, H3 et H4 (²⁷⁰). L'ADN s'enroule autour des histones sur 147pb (figure 16B). Les queues des histones sont libres, à l'extérieur du nucléosome. Cette structure appelée chromatine est ensuite repliée sur elle-même à différents niveaux de compaction (figure 16A). Ces différents niveaux de compaction influent sur la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN, la recombinaison. Les différents niveaux de compaction permettent de définir deux types de chromatines : l'hétérochromatine et l'euchromatine. La première observation de cette différence a été faite par Heitz sur des cellules en interphases. L'euchromatine est peu condensée et donc plus accessible pour la transcription. La majorité des gènes transcrits sont dans l'euchromatine. L'hétérochromatine est une chromatine plus condensée et donc moins facilement transcrite (²⁷¹). L'état de la chromatine n'est pas définitif, il est variable et dépend de facteur de remodelage de la chromatine comme des protéines modifiant les histones ou méthylant l'ADN (²⁷²).

2. Modifications post-traductionnelles des histones

L'extrémité N-terminale des histones est libre. Elle est donc susceptible de subir des modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, la méthylation la phosphorylation, l'ubiquitination, la SUMOylation, l'ADP ribosylation, la déimination et l'isomérisation de proline (^{272,273}) (figure 16C). Ces modifications influent sur la charge globale de l'histone et sur son encombrement stérique. Elles peuvent être reconnues par des protéines et changer l'état de condensation de la chromatine. Les deux modifications les plus étudiées sont la méthylation et l'acétylation des lysines.

L'acétylation des histones neutralise les charges positives des lysines en ajoutant un groupement acétyle non chargé. Cette neutralisation des charges positives réduit l'interaction des histones et l'ADN chargé négativement. Les régions acétylées sont donc généralement associées à de l'euchromatine. L'acétylation est ajoutée par des histones acétyl-transférase (HAT) comme Gcn5 chez *S. cerevisiae*. L'acétylation peut être enlevée par des histones déacétylases (HDAC, voir le paragraphe suivant).

Les histones peuvent être méthylées sur des lysines et des arginines. Ces résidus peuvent être mono-, di- ou tri-méthylés (²⁷³⁻²⁷⁵). La plupart des résidus méthylés sont

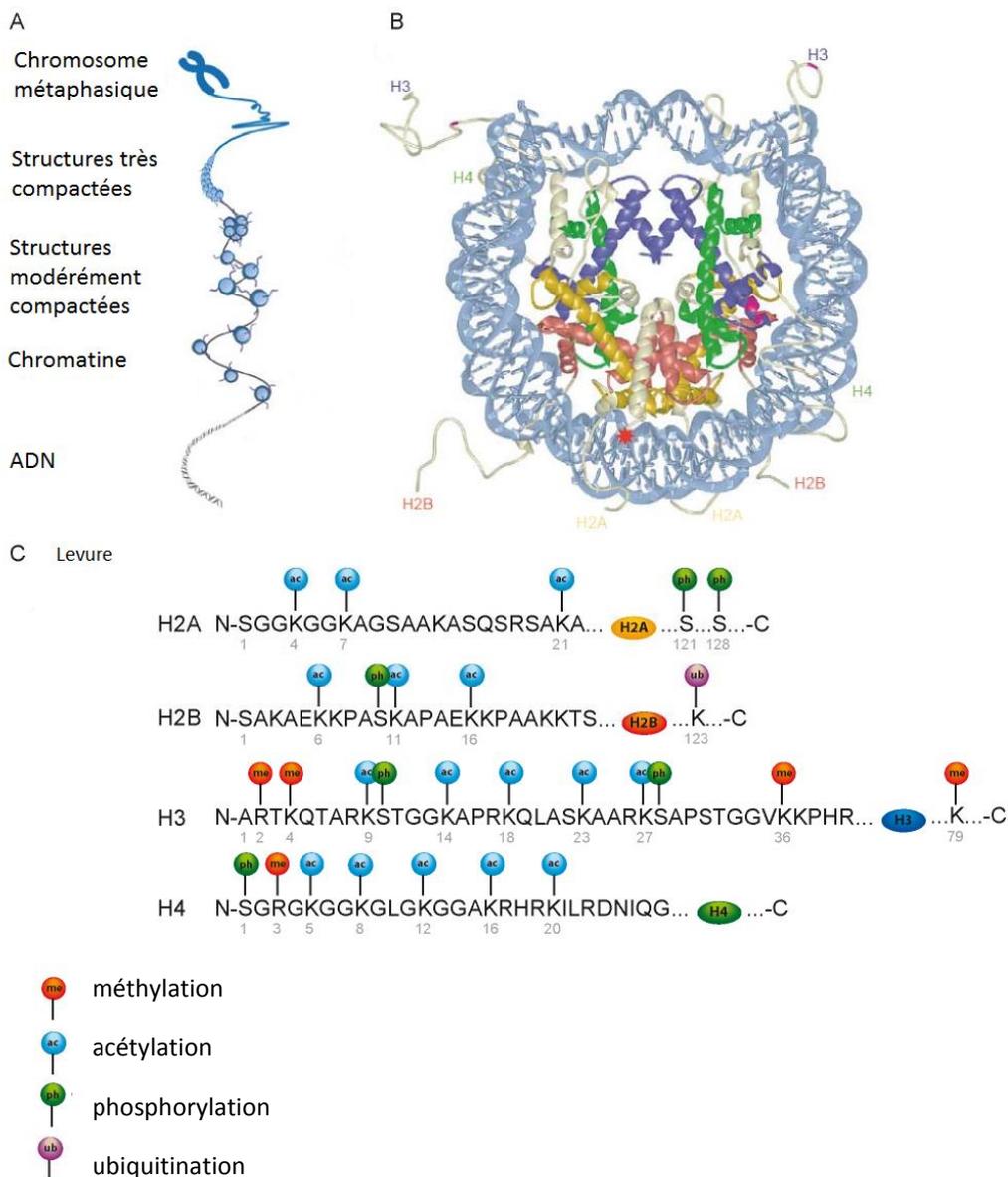


Figure 16 : Chromatine et modifications des histones

- A) Les différents niveaux de compaction de l'ADN. Ils sont variables en fonction du cycle cellulaire, de la différenciation, de la réparation de l'ADN, de la transcription.
- B) Visualisation d'un nucléosome contenant les 8 protéines histones et l'ADN.
- C) Les différents sites de modifications des histones chez la levure, et les modifications associées.

Adapté de Luger et al, Nature, 1997

conservés dans l'évolution. Cependant *S. cerevisiae* se démarque par l'absence de méthylation en H3K9, H3K27 et H4K20. La plupart des histones méthyl-transférase (HMT) possède un domaine SET comme Set1 et Set2. La méthylation des histones n'est pas spécifiquement associée à de l'euchromatine ou de l'hétérochromatine. De plus sur certains résidus le niveau de méthylation peut varier. C'est le cas de H3K4me. La tri-méthylation est abondante au début des gènes actifs et diminue progressivement, la di-méthylation est maximale au milieu des gènes et la mono-méthylation est élevée à la fin des gènes.

Ces modifications peuvent être reconnues par des protéines. Par exemple, la méthylation est reconnue par des protéines contenant des chromodomaines, PHD, MBT ou tudor (²⁷⁶) ; l'acétylation par des bromodomaines (²⁷⁷). De plus certaines modifications peuvent entraîner d'autres. C'est le cas par exemple de H2BK123ubi et H3K4me et H3K79me (^{275,278}) mais de plus en plus d'exemples sont connus (²⁷⁹⁻²⁸⁴). Ces modifications doivent être contrôlées pour permettre un contrôle correct de l'expression des gènes.

II. Les histones déacétylases de *Saccharomyces cerevisiae*

Le domaine HDAC est constitué d'environ 390 acides aminés dont un certain nombre est conservé entre les différentes classes. Le site catalytique contient deux histidines, deux acides aspartiques et une tyrosine (^{285,286}). Il implique un transfert de charge. La présence de Zn^{2+} est très importante dans cette fonction. En 1964, Allfrey et al découvrent qu'il existe une corrélation entre l'acétylation des histones et l'activité des gènes (^{287,288}), observation confirmée 30 ans plus tard par mutations ponctuelles des sites d'acétylation de l'histone H4 (²⁸⁹). Il est intéressant de noter que les histones acétylases sont apparues tôt dans l'évolution. En effet des HDAC existent chez *Mycoplana bullata* et *Aquifex aeolicus*, deux bactéries pourtant dépourvues d'histones (²⁹⁰⁻²⁹²). Il est probable que la fonction première de ce que nous appelons histones-déacétylases ne soit pas celle que cette classe d'enzyme avait à l'origine. Les HDAC sont phylogénétiquement regroupées en 4 grandes classes. Ces classes sont basées sur l'homologie de séquence et de structure avec une HDAC de levure. Ainsi la classe I est composée d'HDAC homologues à Rdp3 de *S. cerevisiae*, la classe II d'HDAC homologues à Hda1 et la classe III d'HDAC homologues à Sir2. Pour cette raison la classe III est aussi appelée Sirtuins. La classe IV n'est pas définie à partir d'une HDAC de levure. Toutes ces classes d'HDAC ont pu être reliées au cancer (²⁹³).

1. Histones déacétylases de classe I

S. cerevisiae possède 3 histones déacétylases de classe I: Rpd3, Hos1 et Hos2. L'HDAC Rpd3 a initialement été découverte dans un crible cherchant des mutants peu sensibles à de faibles concentrations en potassium dans des souches contenant une délétion d'un transporteur du potassium, d'où son nom Rpd3 (Reduced potassium dependency). Plus tard des études ont montré que ce gène était impliqué dans la régulation de la transcription (^{294,295}). Rpd3 déacétyle préférentiellement les gènes impliqués dans la méiose (²⁹⁶). Des études de CHIP on CHIP ont montré que Rpd3 était globalement un répresseur puisque le nombre de gènes dont l'expression avait augmentée était beaucoup plus grand que le nombre de gènes réprimés (^{297,298}). Rpd3 peut déacétyler tous les résidus acétylables sauf H4K16 (²⁹⁹). Hos1 et Hos2 déacétylent majoritairement H4K12 au niveau de l'ADNr et des gènes codant les protéines ribosomiques (²⁹⁶).

2. Histones déacétylases de classe II

La classe II est divisée en IIa et IIb. Les HDAC de classe IIa possèdent un important domaine N-terminal. Chez l'Homme ce domaine est impliqué dans la localisation cellulaire des HDAC. En effet ce domaine possède plusieurs sites d'interaction avec le facteur 14-3-3. L'interaction avec ce facteur stimule la rétention des HDAC dans le cytoplasme (³⁰⁰⁻³⁰²). Il est donc intéressant de noter que les HDAC de classe IIa peuvent faire la navette entre le cytoplasme et le noyau.

Les HDAC de classe IIb ont deux domaines déacétylases en tandem ainsi qu'un domaine en doigt de zinc en C-terminal (³⁰³). Chez l'Homme HDAC6 est capable de déacétyler l' α -tubulin (³⁰⁴) et HSP90 (³⁰⁵). Des HDAC de cette classe sont donc capables de déacétyler des protéines non-histones. De plus cette enzyme est aussi capable de jouer des fonctions cellulaires sans activité HDAC : le domaine en doigt de zinc est capable de reconnaître une ubiquitination. HDAC6 régule ainsi le rôle de la protéine de choc thermique HSF-1 ainsi que du Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (^{306,307}). Des HDAC de cette classe sont donc susceptibles d'agir sans la moindre activité HDAC.

S. cerevisiae possède deux histones déacétylases de classe II : Hda1 et Hos3. Hos3 est capable de déacétyler H4K12ac et H2BK16ac (²⁹⁶). Hda1 a été identifiée suite à la purification de complexe HDAC et analyse de leur composition (³⁰⁸). Hda1 déacétyle plus particulièrement les domaines HAST (Hda1-Affected SubTelomeric). Ces régions contiennent

beaucoup de gènes réprimés par le complexe Tup1-Ssn6. Hda1 déacétyle préférentiellement H3K9, H3K18 et H2BK16 mais aussi H3K14 (³⁰⁹).

3. Histones déacétylases de classe III

S. cerevisiae possède cinq HDAC de classe III : Sir2, Hst1, Hst2, Hst3 et Hst4. Sir2 a été identifié suite à un crible de mutants affectés pour le silence de la région impliquée dans le type sexuel (³¹⁰). La diminution d'acétylation dans des souches surexprimant Sir2 suggérait qu'il s'agissait d'une HDAC (³¹¹). Des études *in vitro* ont ensuite montré que cette protéine était bien une HDAC et que son activité était dépendante de NAD⁺ (³¹²). Sir2 déacétyle principalement H4K16ac dans les régions subtélomériques et les régions responsables du type sexuel (^{296,313}). Mais Sir2 peut aussi déacétyler H4K8ac, H3K9ac et H3K14ac (^{312,314}). La fonction de Hst1 est partiellement redondante de Sir2 : la surexpression de Hst1 supprime le défaut de silence dans un mutant *sir2Δ* (³¹⁵). Hst3 et Hst4 sont impliquées dans le Telomeric Position Effect (TPE) tout comme Hst2 aussi impliquée dans la déacétylation des régions d'ADNr (³¹⁶).

4. Cas particulier de Set3

Set3 est une HDAC particulière. Elle est capable de former un complexe avec d'autres HDAC (Hos2, Hos4, Hst1). Ce complexe est un répresseur des gènes impliqués dans la sporulation (³¹⁷).

III. Quelques exemples chez la levure : longs ARNnc et modifications d'histones

1. Méthylation des histones et régulation de l'expression de *TYI*

Comme nous l'avons vu précédemment, le locus du rétrotransposon exprime un long ARNnc appelé RTL (¹³¹). La stabilisation de cet ARN dans un mutant *xrn1Δ* induit un silence du rétrotransposon *TYI* ainsi qu'une diminution du taux de transposition. Ce silence est supprimé dans le double mutant *xrn1Δset1Δ*. Cet ARNnc peut agir en *trans* puisque la production de *RTL* à partir d'un plasmide a le même effet sur *TYI* que la délétion de *XRNI*. Aucune variation d'acétylation n'a pu être montrée aux loci *TYI* entre les souches sauvage, *xrn1Δ*, *set1Δ* et *xrn1Δset1Δ*. Le silence du rétrotransposon est en partie transcriptionnel puisque la délétion de *XRNI* entraîne une diminution de la transcription du *TYI*. De plus

l'utilisation d'inhibiteur d'histone déacétylase de classe I/II ou III suggère que des HDAC sont aussi impliquées dans la répression du *TY1* par *RTL*.

2. Déacétylation et régulation de l'expression de *PHO84*

La déacétylation d'histones est aussi impliquée dans la régulation du gène *PHO84* par un ARNnc codant antisens de type CUT (¹⁴¹). La délétion de *RRP6* induit la stabilisation d'un long ARNnc antisens du gène *PHO84*. Cette stabilisation s'accompagne d'un silence de *PHO84*. La délétion de *HDA1* supprime ce silence. De manière surprenante Hda1 est déjà présent sur la chromatine au niveau du gène *PHO84* mais aussi sur les gènes adjacents alors que la déacétylation n'a lieu que sur le gène *PHO84*. Il est possible que le ciblage de la déacétylation soit réalisé par la transcription ou par l'ARNnc antisens (figure 17). Il est possible que l'ARNnc forme un hybride ARN/ADN avec le gène en cours de transcription ou bien que l'ARNnc forme un ARNdb avec l'ARNm de *PHO84*. De manière surprenante cet ARNnc peut aussi agir *in trans* mais d'une manière totalement indépendante de Hda1. Dans ce cas le silence est dépendant de Set1 (¹¹⁸).

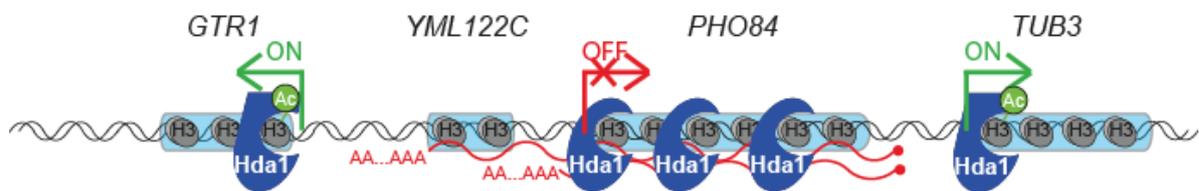


Figure 17 : Régulation du locus *PHO84* par un ARNnc

La stabilisation de l'ARN antisens de *PHO84* entraîne la déacétylation du locus de *PHO84* par Hda1 ce qui provoque l'extinction du gène. Adapté de Camblong et al, Cell, 2007.

3. Méthylation/Déacétylation et régulation du locus *GALI-10*

Dans ce cas précis la transcription cryptique d'un ARNnc entraîne le dépôt de la marque H3K4me2/3 par Set1. Cette transcription est contrôlée par le facteur de transcription Reb1. Cette marque provoque un retard dans le recrutement de la machinerie de transcription lorsque que les levures passent d'un milieu contenant du glucose à un milieu contenant du galactose. H3K4me2/3 est responsable du recrutement de l'HDAC Rpd3 au niveau du locus *GALI-10*. Le recrutement de Rpd3 atténue l'induction de *GALI* (¹⁶²) (figure 18). Rpd3 est

aussi impliquée dans la régulation du gène *FLO11* par ses deux ARNnc *ICR1* et *PWR1* (¹⁶³) (figure 8).

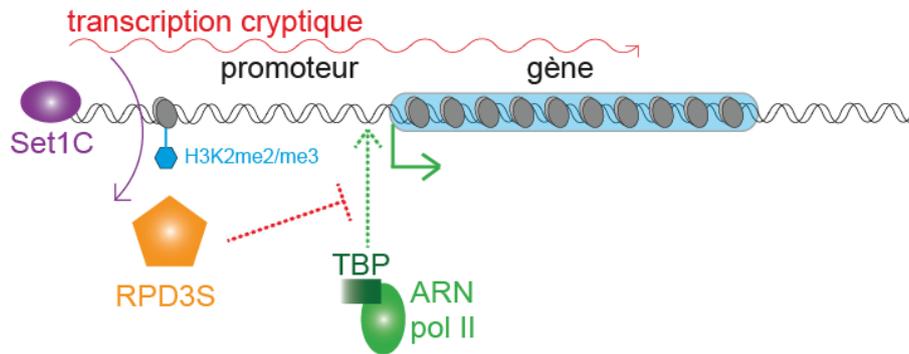


Figure 18 : Régulation du locus GAL1-10 par un ARNnc

La transcription cryptique de *GALucut* entraîne la méthylation H3K4me2/3 du promoteur de *GAL1*. Cette modification d'histones conduit au recrutement de Rpd3 ce qui provoque l'extinction du gène *GAL1*. Adapté de Pinskaya et al, EMBO J, 2009.

4. Ciblage de l'activité Histone-déacétylase

Chez la levure *S. cerevisiae*, la transcription d'ARNnc a déjà été associée au dépôt de la marque H3K4me2. Cette modification est reconnue par le complexe Set3 qui déacétyle alors localement les histones entraînant ainsi la répression du gène associé (^{162,318}). Lors de l'établissement de l'hétérochromatine centromérique par des ARNnc chez *S. pombe*, des histones déacétylases sont impliquées. Cependant le recrutement direct des HDAC par des ARNnc dans ce cas n'a jamais été montré. Le positionnement des HDAC pourrait être dû à la marque H3K9me déposée par la complexe CLR, qui lui est recruté par l'hybridation d'un siARN à un ARN néo-naissant (⁵¹). C'est aussi le cas pour le silence du VIH-1 chez l'Homme. Des siARN sont produits à partir du promoteur du 5' Long Terminal Repeat. Ces siARN provoquent le silence de VIH-1 grâce à la marque H3K9me2 et à l'histone déacétylase HDAC-1 (^{319,320}). Le Virus de l'Immunodéficience Simienne (VIS), le gène UbC peut aussi être réprimé grâce aux mêmes acteurs (^{321,322}). Le ciblage des HDAC pourrait donc être dû à la reconnaissance de la méthylation des histones. Les HDAC agiraient après les histones-méthyl-transférases. Le ciblage interviendrait ainsi *via* la mise en place d'une première marque épigénétique due à l'ARNnc.

Cependant d'autres mécanismes d'actions sont à envisager. Bien que cela n'ait pas encore été montré, il se pourrait que les HDAC soient recrutées ou activées grâce à des interactions avec l'ARNnc lui-même, avec des ARN double-brins ou grâce à la

reconnaissance de boucle R impliquant un hybride ARNnc/ADN. En effet, de manière frappante, la déacétylation du gène *PHO84* en présence de son antisens est localisée sur le gène *PHO84* bien que Hda1 soit présente aussi sur les gènes adjacents chez *S. cerevisiae* (¹⁴¹). De tels mécanismes sont envisageables pour cet exemple. Mais comme l'histone méthyl-transférase est aussi requise pour le silence de *PHO84* il est fort probable que ce soit la marque H3K4me2 qui régule l'activité de Hda1 (³²³). Il serait envisageable que ce soit l'histone méthyl-transférase Set1 qui soit ciblée sur l'ADN grâce à l'ARNnc. En effet Set1 possède deux motifs de reconnaissance de l'ARN appelés RRM1 et RRM2 (³²⁴). Cependant, puisque la délétion spécifique de ces domaines n'a aucun effet sur la répression de *PHO84* ce n'est sans doute pas le cas (³²³).

Problématique :

Les modifications épigénétiques que sont les modifications d'histones sont cruciales pour la régulation des gènes, la transcription et la réparation de l'ADN. Afin d'assurer un bon fonctionnement de la cellule, ces modifications doivent être contrôlées. Des dysfonctionnements peuvent être à l'origine de cancers. Ces modifications peuvent être ajoutées suite à la transcription d'un gène (*GALI-10*, *ICRI* pour ne citer que ces exemples chez *S. cerevisiae*) où via l'action d'un ARNnc (*HOTAIR*, *XIST* chez l'Homme, *RTL* chez *S. cerevisiae* par exemple). Jusqu'à aujourd'hui les 2 modifications les plus étudiées et ayant un lien clairement établi avec la régulation de l'expression de gènes sont la méthylation et l'acétylation.

Chez *S. cerevisiae*, les trois exemples cités dans la partie précédente montrent bien le lien important entre modifications des histones et contrôle de l'expression de gènes par des ARNnc. De plus, il semble exister un lien fort entre méthylation des histones et action d'HDAC. Cependant le lien précis entre ces deux facteurs reste à montrer pour *PHO84* et *TYI*. En outre, trois exemples impliquant des histones déacétylases et des ARNnc ne sont pas suffisant pour généraliser ce mode d'action. Nous avons donc cherché d'autres exemples d'ARNnc régulateurs faisant intervenir des HDAC. Nous avons aussi cherché à comprendre le mécanisme par lequel les HDAC sont impliqués dans la régulation de gènes.

De plus il semble que l'ARNnc puisse servir au ciblage de l'histone méthyltransférase ou de l'HDAC. Ce ciblage pourrait être dû à la formation d'hybride ARN/ADN entre l'ARNnc et l'ADN du gène cible étant donné que les ARNnc considérés sont antisens du gène correspondant. La formation de cet hybride pourrait se faire suite à la transcription de l'ARNnc ou de l'ARNm. Cette structure pourrait constituer un signal pour les différents effecteurs. Ce ciblage pourrait aussi être réalisé par la formation d'ARNdb entre l'ARNnc et l'ARNm. Cet ARNdb pourrait être formé entre l'ARNm en cours de synthèse et l'ARNnc, entre l'ARNm et l'ARNnc en cours de synthèse ou entre des ARN déjà synthétisés.

Le projet de thèse s'articule donc autour de deux axes. Dans un premier temps, je me suis attaché à isoler un cas de silence transcriptionnel identifié à partir de l'étude des XUT chez la levure. Le gène *TIR1* est exprimé dans une souche sauvage en croissance exponentielle et sous-exprimé lorsqu'un XUT est exprimé. Nous avons cherché à établir si les HDAC sont impliquées dans cette fonction et de disséquer les domaines impliqués.

Dans un deuxième temps, j'ai tenté en vain de mettre en place un outil génétique pour révéler la présence d'hybride ARN/ADN *in vitro* en utilisant un anticorps reconnaissant ce type de structure.

Deuxième Chapitre : Résultats et Discussion

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la présence de XUT antisens de gènes est corrélée à une baisse de la transcription. Un des cas les plus frappants est le gène *TIR1* contenant l'antisens *TIR1axut*. Pour *TIR1* l'absence de Xrn1 contribue à une extinction de l'expression avec une large diminution de l'ARNm (figure 19A). De nombreuses analogies peuvent être dressées entre les régulations de *TIR1* et du rétrotransposon *TY1*. Ils contiennent un antisens cryptique XUT dont l'accumulation conduit à l'inactivation du gène. Cette dernière est transcriptionnelle et requiert l'Histone Méthyl-Transférase (HMT) Set1 (^{125,131}). Le principal avantage de *TIR1* est de n'être présent qu'en uni-copie dans le génome facilitant ainsi les études approfondies.

. Métabolisme du gène *TIR1*

I. Facteur de régulation du gène *TIR1*

TIR1 est un gène codant une mannoprotéine de la paroi. Il appartient à la famille des gènes DAN/TIR composés des gènes *DAN1*, *DAN2*, *DAN3*, *DAN4*, *TIR1*, *TIR2* et *TIR3* (³²⁵). Ces gènes sont réprimés en condition aérobie et induits dans des conditions anaérobies, dans des cultures stagnantes (³²⁶) ou à faible température (³²⁷) et en milieu acide (³²⁸). Les facteurs de répression associés à cette classe de gènes sont nombreux mais contrairement à la majorité des gènes hypoxiques leur expression n'est pas régulée par le gène *ROX1* (³²⁹). En revanche tous les gènes hypoxiques identifiés jusqu'à maintenant sont réprimés par un hème (³³⁰⁻³³⁴). Les différents facteurs impliqués dans la régulation de l'expression de *TIR1* sont récapitulés en figure 19B.

Le complexe Tup1-Ssn6 intervient aussi dans la répression de gènes hypoxiques. Ce complexe intervient aussi dans la répression d'un grand nombre de voies métaboliques. Ce facteur n'a pas de séquence consensus de fixation à l'ADN. Il est recruté par des cofacteurs comme Mig1 pour les gènes réprimés en présence de glucose (³³⁵), Rfx1 pour les gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN (³³⁶), $\alpha 2$ pour les gènes réprimés dans des cellules Mat a (^{337,338}), Nrg1 pour les gènes impliqués dans la dégradation de l'amidon (³³⁹), Sko1 pour les gènes induits suite à un stress osmotique (³⁴⁰), Aft1 pour les gènes impliqués

dans le métabolisme du fer (³⁴¹), Cup9 pour les gènes impliqués dans l'absorption de peptides (³⁴²) et Rox1 (³⁴³).

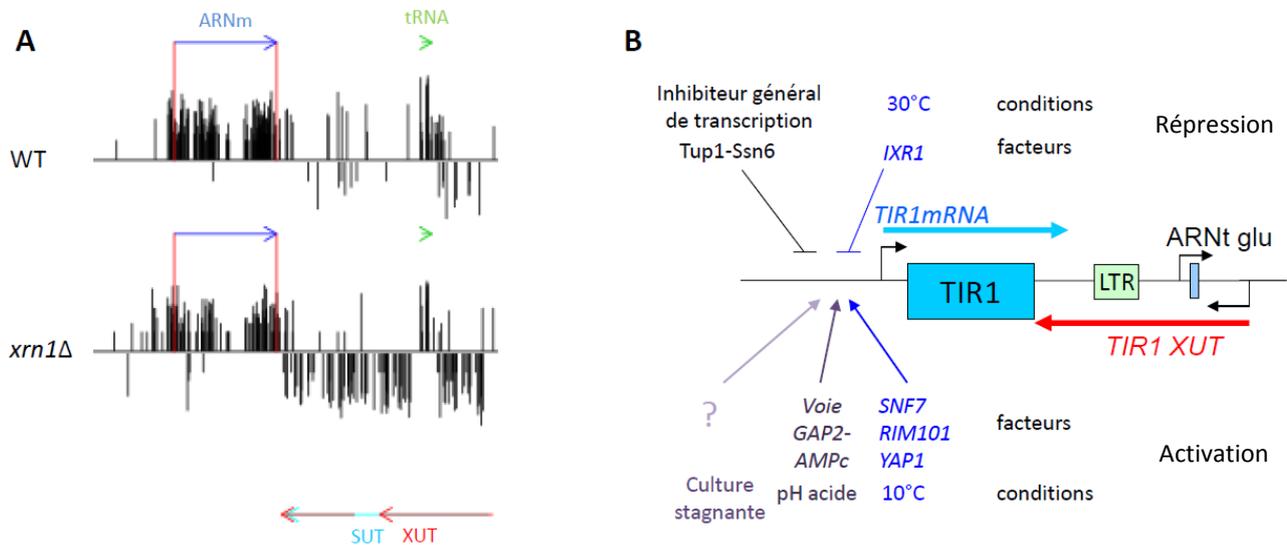


Figure 19 : Régulation du gène *TIR1*

A) Données de séquençage haut débit montrant la stabilisation du *TIR1axut* et la diminution du niveau d'ARN de *TIR1* dans un mutant *xrn1Δ*. Les données de séquençage haut débit sont présentées de la manière suivante : chaque barre verticale correspond à un nucléotide. La taille d'une barre correspond au nombre de fois où le nucléotide a été séquencé. L'échelle verticale est logarithmique. Une barre orientée vers le haut indique que le nucléotide est transcrit à partir du brin Watson alors qu'une barre orientée vers le bas correspond à un nucléotide transcrit à partir du brin Crick.

B) Facteurs connus régulant l'expression de *TIR1*

Tup1 interagit avec les histones H3 et H4, préférentiellement hypoacétylées (^{344,345}). De plus, Tup1-Ssn6 interagit physiquement avec des histones déacétylases : *in vivo* pour Rpd3, Hos1 et Hos2 (³⁴⁶) et *in vitro* pour Hda1 (³⁴⁷). Bien qu'une interaction physique entre Tup1-Ssn6 n'ait pas encore été caractérisée, beaucoup de gènes déréprimés en absence de Hda1 sont réprimés par Tup1 (²⁹⁶). Cependant la délétion de Hda1 n'affecte que 30% des gènes dont l'expression est contrôlée par Tup1 (³⁴⁸). Le modèle de régulation des gènes par Tup1-Ssn6 proposé est le suivant : Tup1-Ssn6 est recruté par des répresseurs au niveau de promoteurs des gènes réprimés, ce recrutement est facilité si les histones sont hypoacétylées, puis les HDACs recrutées déacétylent les histones renforçant le recrutement de Tup1-Ssn6 dans une boucle positive (³⁴⁹). Mais Tup1 et Ssn6 ne sont pas les seuls facteurs impliqués dans la régulation de *TIR1*. *SNF7* et *RIM101* sont des activateurs de ce gène via des séquences spécifiques dans le promoteur (³⁵⁰). *Ixr1* est lui aussi impliqué dans la régulation de l'expression de *TIR1* (^{351,352}).

II. Répression du gène *TIR1* après inactivation de Xrn1

L'observation d'un effet de la mutation *xrn1Δ* sur l'expression d'un gène a été faite par séquençage haut débit en comparant le transcriptome d'une souche sauvage avec celui d'une souche *xrn1Δ* (figure 19A). En 3' de *TIR1* on note la présence d'un Stable Unannotated Transcript (SUT) qui s'accumule dans le mutant *xrn1Δ* définissant un XUT (en rouge). Cet ARNnc chevauche la toute fin de l'ARNm de *TIR1*. Il lui est donc partiellement antisens notamment dans la région 3' UTR. De plus cette accumulation du XUT est corrélée à une importante réduction de la quantité de l'ARNm de *TIR1*. Il a été établi que l'interruption du XUT ou l'absence de Set1 restaure partiellement l'expression de *TIR1* (¹²⁵). Peu d'information sont disponibles. En particulier, le rôle et le mécanisme d'action des Histone-DéACétylases (HDAC) dans la régulation de *TIR1* reste à établir.

III. Dynamique de l'extinction de *TIR1*

Afin de comprendre la dynamique d'extinction de *TIR1* par *TIR1axut* nous avons utilisé un mutant thermosensible Xrn1ts exprimant une protéine Xrn1 active à 25°C mais inactive à 37°C (³⁵³). En récupérant des cellules à différents temps après choc thermique nous envisageons de déterminer la cinétique de stabilisation de *TIR1axut* et de l'extinction de *TIR1*. Pour cela une souche *xrn1Δ* a été transformée avec soit un plasmide vide, soit avec un plasmide exprimant Xrn1 sauvage (pXrn1), soit avec un plasmide exprimant Xrn1ts (pXrn1ts).

Ces différentes souches ont été cultivées en CSM-URA afin d'assurer du maintien du plasmide à 25°C et les cultures ont été diluées à une densité optique à 600nm (DO₆₀₀) de 0,1. Une fois que la DO₆₀₀ a atteint 0,5 elles ont été transférées en YPD pendant 3h toujours à 25°C. Ce transfert est nécessaire pour maintenir une expression de *TIR1* à un niveau acceptable, *TIR1* étant sensible à la richesse du milieu de culture. La température a ensuite été basculée à 37°C pendant 3h afin d'inactiver Xrn1ts, puis de nouveau à 25°C pour le réactiver. Des aliquots de ces cultures ont été pris régulièrement et les ARN extraits. L'ARNm de *TIR1* et le XUT de *TIR1* ont été quantifiés par RT-PCRq en utilisant une amorce spécifique pour chacun de ces ARN (figure 20C et D). Les résultats ont été normalisés en utilisant le gène *RPO21* et arbitrairement fixés à 1 à t=0.

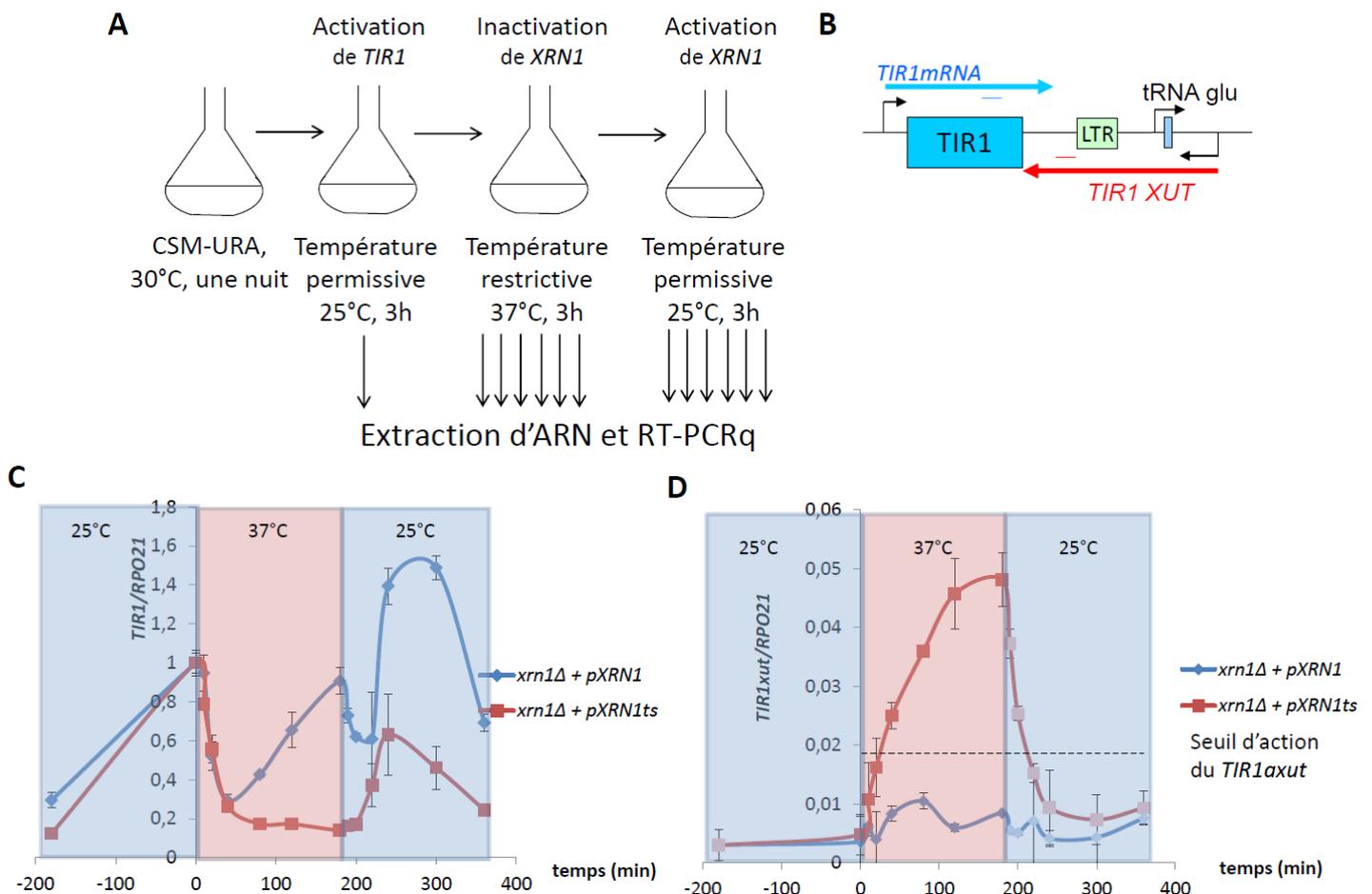


Figure 20: inactivation de Xrn1 et expression de *TIR1*

A) Protocole utilisé pour étudier l'effet de l'inactivation de Xrn1. Les différentes souches sont cultivées en CSM-URA durant une nuit, elles sont ensuite transférées en milieu YPD à 25°C pendant 3h, puis transférées à 37°C pendant 3h, puis de nouveau à 25°C pendant 3h.

B) Schéma du locus de *TIR1*. Les amorces utilisées pour réaliser les transcriptions inverses de *TIR1m* et de *TIR1axut* sont figurées en bleu et rouge respectivement.

C) Variation de la quantité de *TIR1m* en fonction de l'état de Xrn1 (zone bleu = actif, zone rouge = inactif) par RT-PCRq. Une RT est effectuée avec une l'amorce représentée en bleu en B et une amorce spécifique du gène *RPO21*. Les données sont normalisées par rapport à ce gène.

D) Même analyse qu'en C mais en utilisant une amorce spécifique au XUT (en rouge en B) Les barres d'erreurs représentent les déviations standards sur des triplicats indépendants.

Nos résultats montrent tout d'abord que la quantité d'ARNm de *TIR1* est faible tant que les cellules sont en milieu minimum à 30°C ($t=-180\text{min}$) pour les souches *xrn1Δ + pXrn1* et *xrn1Δ + pXrn1ts*, ce qui est cohérent avec la régulation physiologique de *TIR1*. Après 3h à 25°C en milieu riche l'expression de *TIR1* est multipliée par 4 pour la souche *xrn1Δ + pXrn1* et par 9 pour la souche *xrn1Δ + pXrn1ts* (figure 20C et 20D, partie bleue de gauche).

L'induction n'a pas été aussi efficace dans les 2 cas mais nous pouvons quand même mesurer des vitesses d'apparition et de disparition.

Deuxièmement, concernant l'effet de l'inactivation de Xrn1 sur l'expression de *TIRI* et de son *XUT* (figure 20C et D, zone en rouge). Cette période est découpée en 2 parties. La première va de t=0 à t=40min. La seconde va de t=40min à t=180min.

1. Etablissement de la répression entre t=0 et t=40min.

Observons tout d'abord les variations de niveau du XUT de *TIRI* entre t=0 et t=40min (figure 20D, zone rouge). Pour la souche *xrn1Δ + pXrn1* la quantité du XUT reste à un niveau très faible même après le choc thermique. Ceci est cohérent avec le fait que cette souche exprime toujours Xrn1. En revanche la souche *xrn1Δ + pXrn1ts* voit le niveau de *TIRIaxut* augmenter très rapidement. Lors des 40 premières minutes à 37°C, la quantité d'ARN est multipliée par 5 reflétant la sensibilité de *TIRIaxut* à l'activité de *XRN1*. En revanche, *TIRIm* diminue de moitié en 20 minutes, à la fois dans la souche contenant Xrn1ts et la souche *XRN1* (figure 21A), indiquant que le choc thermique est responsable de cette diminution.

Cette première partie permet de tirer 3 conclusions. La première est que l'inactivation de Xrn1 entraîne bien une stabilisation très rapide du XUT de *TIRI*. La deuxième est qu'il semble que le choc thermique induit une chute brutale de la quantité d'ARNm de *TIRI* quelle que soit la souche. En effet la décroissance de l'ARNm de *TIRI* est identique que le XUT s'accumule ou non. Et enfin la troisième est qu'il n'est pas possible de voir un potentiel effet du XUT de *TIRI* sur le niveau d'ARNm de *TIRI* en raison de l'effet d'un choc thermique sur ce gène.

2. Maintien de la répression de *TIRI* entre t=40min et t=80min

La quantité de *TIRIaxut* reste faible et varie très peu pour la souche *xrn1Δ + pXrn1*. En revanche la quantité de *TIRIaxut* continue d'augmenter pendant cette même phase pour la souche *xrn1Δ + pXrn1ts*, même si la vitesse est moins rapide que dans les 40 premières minutes à 37°C. Le niveau de *TIRIaxut* semble même atteindre un plateau aux alentours de t=180min.

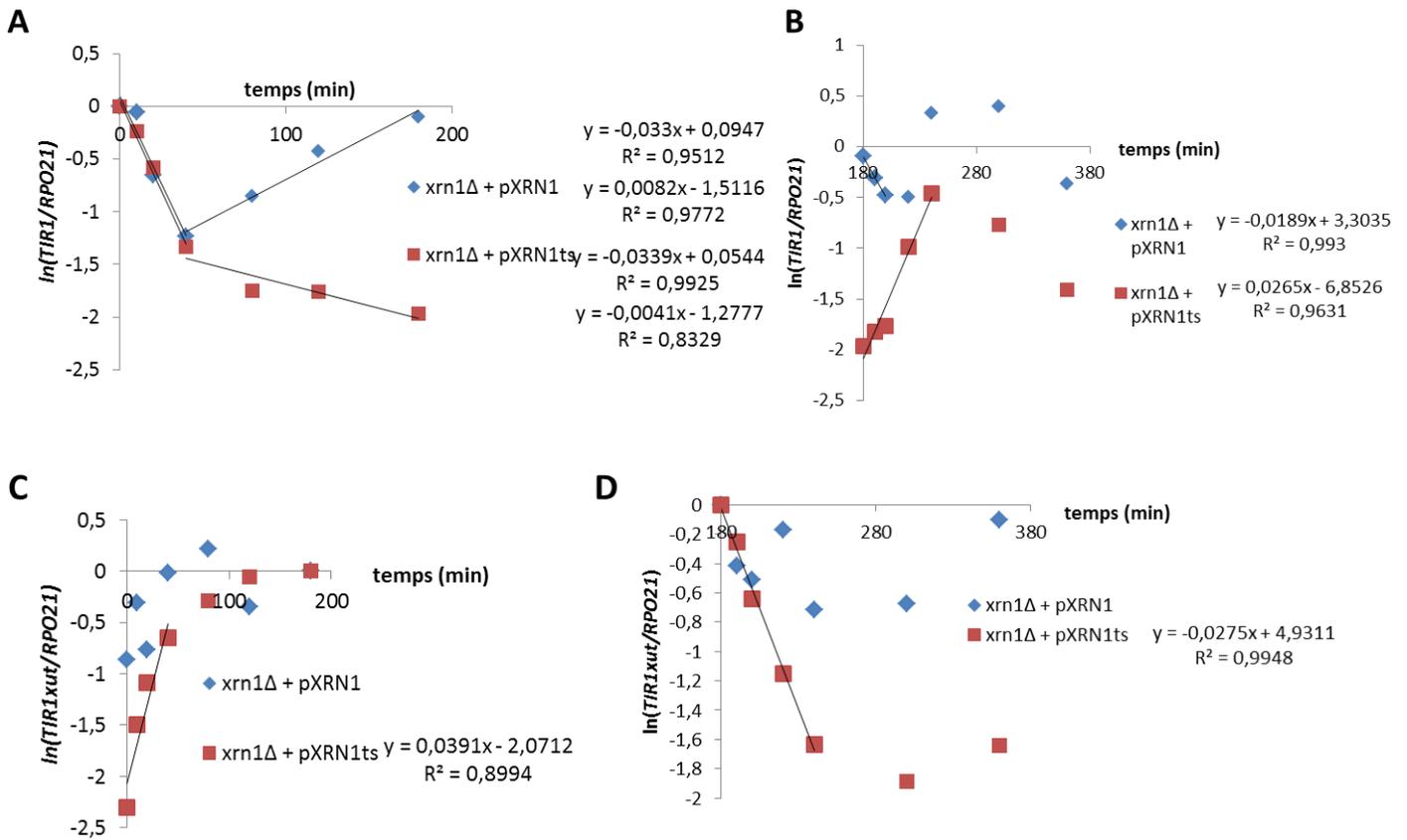


Figure 21 : Cinétique d'induction et de répression

Estimation de la vitesse d'apparition ou de disparition de *TIR1* et de *TIR1axut*. Ces graphiques représentent $\ln(\text{ARN}/\text{RPO21})$ en fonction du temps. Ils permettent le calcul de temps de doublement ou de demi-vie.

A) Disparition de *TIR1m*. B) Apparition de *TIR1axut*. C) Apparition de *TIR1m*. D) Disparition de *TIR1axut*.

Les équations des droites obtenues par régression linéaire ainsi que les coefficients de corrélation sont indiqués. La demi-vie ou le temps de doublement d'un ARN est égale à $\ln(2)/\text{pente}$. Lorsque 2 équations sont indiquées à côté de la souche la première correspond aux 40 premières minutes, la seconde aux 120 minutes suivantes.

Concernant l'ARNm de *TIR1*, le comportement des deux souches diffère complètement à partir de $t=40\text{min}$. En effet le niveau de *TIR1* dans la souche *xrn1Δ + pXrn1* augmente de nouveau dès $t=60\text{min}$ et ne cesse d'augmenter jusqu'à $t=180\text{min}$. En 140 minutes la quantité d'ARNm de *TIR1* a été multipliée par 3 pour passer de 0,3 à 1. La quantité d'ARNm de *TIR1* double environ toutes les 60min (figure 21A). *TIR1* est donc ré-exprimé 40 minutes après le choc thermique, reflétant certainement une adaptation de la cellule au choc thermique. En revanche la souche *xrn1Δ + pXrn1ts* a un tout autre comportement : la quantité d'ARNm de *TIR1* continue de diminuer pour atteindre un minimum aux alentours de $t=180\text{min}$, niveau proche de celui observé dans un état réprimé ($t=-180\text{min}$, culture en CSM).

A ce stade il est frappant de constater qu'il existe donc bien un lien entre accumulation du XUT et diminution du niveau d'ARNm de *TIRI*.

Cette partie permet de tirer une conclusion majeure. La présence de *TIRI_{axut}* maintient un faible niveau d'ARNm de *TIRI*. En effet le niveau de d'ARN de *TIRI* est 5 fois inférieur dans la souche *Xrn1_{ts}* par rapport à a la souche *Xrn1* sauvage après 3h d'inactivation de *Xrn1*. S'il est impossible de corrélérer l'initiation de la répression de *TIRI* à l'accumulation du XUT, le maintien de cette répression est incontestablement dû à la présence du XUT.

3. Réactivation de *TIRI* (t > 180min)

Après 180 minutes à 37°C, les cultures sont de nouveau transférées à température permissive (25°C) afin d'observer à quelle vitesse l'ARN de *TIRI* retrouve son niveau de départ et à quelle vitesse le XUT de *TIRI* disparaît (figure 20C et 20D, zone bleue de droite).

Après passage à 25°C la quantité de *TIRI_{axut}* reste identique à celle à 37°C. De plus elle reste constante pendant les 180 minutes à 25°C pour la souche *xrn1Δ* + p*Xrn1*. *Xrn1* reste donc fonctionnelle que la température soit de 25°C ou de 37°C. En revanche, pour la souche *xrn1Δ* + p*Xrn1_{ts}* la quantité de *TIRI_{axut}* diminue rapidement après passage à température permissive. En effet la quantité de *TIRI_{axut}* est divisée par 5 en passant de 0,05 à 0,01 en seulement 120 minutes. Pendant cette période la quantité de *TIRI_{axut}* est divisée par 2 toutes les 24 minutes (figure 21D). En outre la quantité de *TIRI_{axut}* ne diminue plus au-delà de 120 minutes à température permissive et le niveau de *TIRI_{axut}* est proche de celui avant l'inactivation de *Xrn1*. Il faut donc environ 120 minutes pour que *TIRI_{axut}* soit entièrement dégradé.

Observons maintenant l'effet du passage à température permissive sur le niveau d'ARNm de *TIRI*. Dans les 30 premières minutes qui suivent le passage à température permissive la quantité d'ARNm de *TIRI* est presque divisée par 2 pour passer de 1 à 0,6 *xrn1Δ* + p*Xrn1_{ts}*. Le choc thermique induit donc ici aussi une diminution de l'expression de *TIRI*. Par la suite le niveau d'ARNm augmente de nouveau rapidement. Il atteint le même niveau qu'à t=0. Les températures utilisées ici ne sont pas directement responsables du niveau d'expression de *TIRI*. En revanche le choc thermique semble être le facteur déclenchant la diminution d'expression de *TIRI*. Pour la souche *xrn1Δ* + p*Xrn1_{ts}* le niveau d'ARNm de *TIRI* varie très peu lors des 20 premières minutes. La quantité de *TIRI_{axut}* encore présente

doit être suffisante pour réprimer *TIR1*. Cependant au bout de 30 minutes la quantité d'ARNm de *TIR1* augmente très rapidement pour passer de 0,3 à 1. La quantité d'ARNm double environ toutes les 28 minutes (figure 21B).

L'observation de l'augmentation de niveau de *TIR1* après réactivation de *Xrn1* permet de tirer 2 conclusions. Premièrement *TIR1axut* est rapidement dégradé dès que *Xrn1* est de nouveau active. Deuxièmement cette dégradation est corrélée avec une augmentation du niveau de *TIR1*.

L'ensemble de ces résultats permet d'affirmer qu'il existe un lien très fort entre niveau de *TIR1axut* et niveau de *TIR1*. En effet il existe une anti-corrélation entre la présence de *TIR1axut* et de l'ARNm de *TIR1* : si l'un a un niveau élevé, l'autre a un niveau faible. *TIR1axut* semble donc clairement intervenir dans le maintien de l'état de répression de *TIR1*. La seconde conclusion est que *TIR1* est un gène extrêmement sensible aux variations de température : non seulement une diminution de la température induit ce gène mais une augmentation réprime ce gène. Ceci implique aussi que pour différencier les effets de la température et de *Xrn1* sur l'expression de *TIR1*, le mutant *Xrn1ts* ne peut pas être utilisé. Pour la suite des expériences, nous nous contenterons d'un mutant *xrn1Δ* et étudierons les effets à l'équilibre. Ceci implique aussi qu'il n'est pas possible de corréler la vitesse de disparition de *TIR1* avec la vitesse d'apparition du *TIR1axut*. Toutefois il est possible de définir un seuil de quantité de XUT suffisant pour le maintien de l'inactivation de *TIR1*. En effet dès que le rapport *TIR1axut/RPO21* descend en dessous de 0,02 le niveau d'ARNm de *TIR1* augmente rapidement.

Il existe donc un lien très fort entre un gène réprimé dans un mutant *xrn1Δ* et la présence d'un ARNnc antisens. Cependant le mode d'action des XUT sur les gènes qu'ils répriment n'est pas connu.

. Histones déacétylases et gènes réprimés par des XUT

Nous avons vu que plusieurs exemples de gènes régulés par un ARNnc faisaient intervenir des complexes d'histones déacétylases (HDAC). En effet le gène *PHO84* est réprimé en présence d'un CUT, cette régulation étant dépendante de l'histone déacétylase Hda1 (¹⁴¹). Le gène *GAL10* est réprimé par un XUT antisens via l'action de Rpd3 (¹⁶²). Nous avons donc voulu savoir si les histones déacétylases étaient systématiquement impliquées dans la répression de gènes par des XUT. Pour cela nous avons tout d'abord identifié quelles HDAC étaient impliquées dans la répression des gènes *Ty1* et *TIR1*.

I. Hda1 est nécessaire à la répression du *Ty1* et de *TIR1*

Afin d'identifier les HDAC potentiellement impliquées dans la régulation de gènes par des XUT nous avons effectué un crible candidat. Pour cela nous avons cherché à identifier la classe d'HDAC qui pouvait effectuer cette régulation. Dans les souches *set3Δ*, *rpd3Δ*, *hda1Δ*, *hst1Δ*, *hst2Δ* et *hst3Δ* nous avons inactivé le gène *XRN1* puis extrait les ARN totaux après culture en milieu riche à 30°C. Ces ARN ont été utilisés pour faire un Northern Blot et des RT-PCRq. Des sondes oligonucléotidiques spécifiques marquées radioactivement ont ensuite été utilisées pour détecter les ARN de *Ty1*, *TIR1*, l'ARNnc *RTL* ainsi que l'ARN *scR1* qui sert de contrôle de charge.

1. Analyse par Northern Blot

a. Cas du rétrotransposon *Ty1*

Les résultats obtenus suite à ce Northern blot sont présentés en figure 22A. Le Northern blot n'étant pas à proprement parler une méthode quantitative nous ne nous intéresserons ici qu'à l'aspect qualitatif. Dans la souche sauvage le rétrotransposon *Ty1* est bien exprimé (ligne 1). Dans le mutant *xrn1Δ* l'intensité de cette bande diminue montrant ainsi une répression du rétrotransposon *Ty1* dans ce mutant. Parallèlement à cette répression l'accumulation de l'ARNnc *RTL* est observée dans ce même mutant (ligne 2). Ces résultats sont en accord avec les résultats déjà publiés par le laboratoire (^{125,131}). Lorsque le gène de l'histone déacétylase Set3 est délété le niveau d'ARN de *TY1* ne semble pas affecté. Une délétion de *XRN1* dans cette souche entraîne bien l'accumulation de *RTL* mais sans changer la quantité d'ARN de *TY1* par rapport à la souche *xrn1Δ*. Set3 n'est donc pas impliquée dans la répression du *Ty1* par l'ARNnc *RTL*. Des résultats similaires sont observés pour *RPD3* et *HST3*. En revanche la délétion de l'histone déacétylase Hst1 semble avoir un effet : l'ARN de

TY1 à totalement disparu dans le double mutant *xrn1Δhst1Δ*. Mais les résultats obtenus avec les gènes *HST2* et *HDA1* sont plus intéressants encore. En effet dans ces deux cas les quantités d'ARN de *Ty1* semblent identiques entre les simples mutants *hda1Δ/hst2Δ* et les doubles mutants *xrn1Δhda1Δ/xrn1Δhst2Δ*. Il y a donc bien dérégulation complète de *TY1* dans ces deux doubles mutants. Hst2 et Hda1 pourraient donc être impliquées dans la répression du *TY1* par le *RTL*.

b. Cas du gène *TIR1*

Le niveau d'ARNm du gène *TIR1* a aussi été mesuré. Les résultats obtenus avec ce gène sont assez proches de ceux obtenus avec le rétrotransposon *Ty1*. Les mutants *rpd3Δ* et

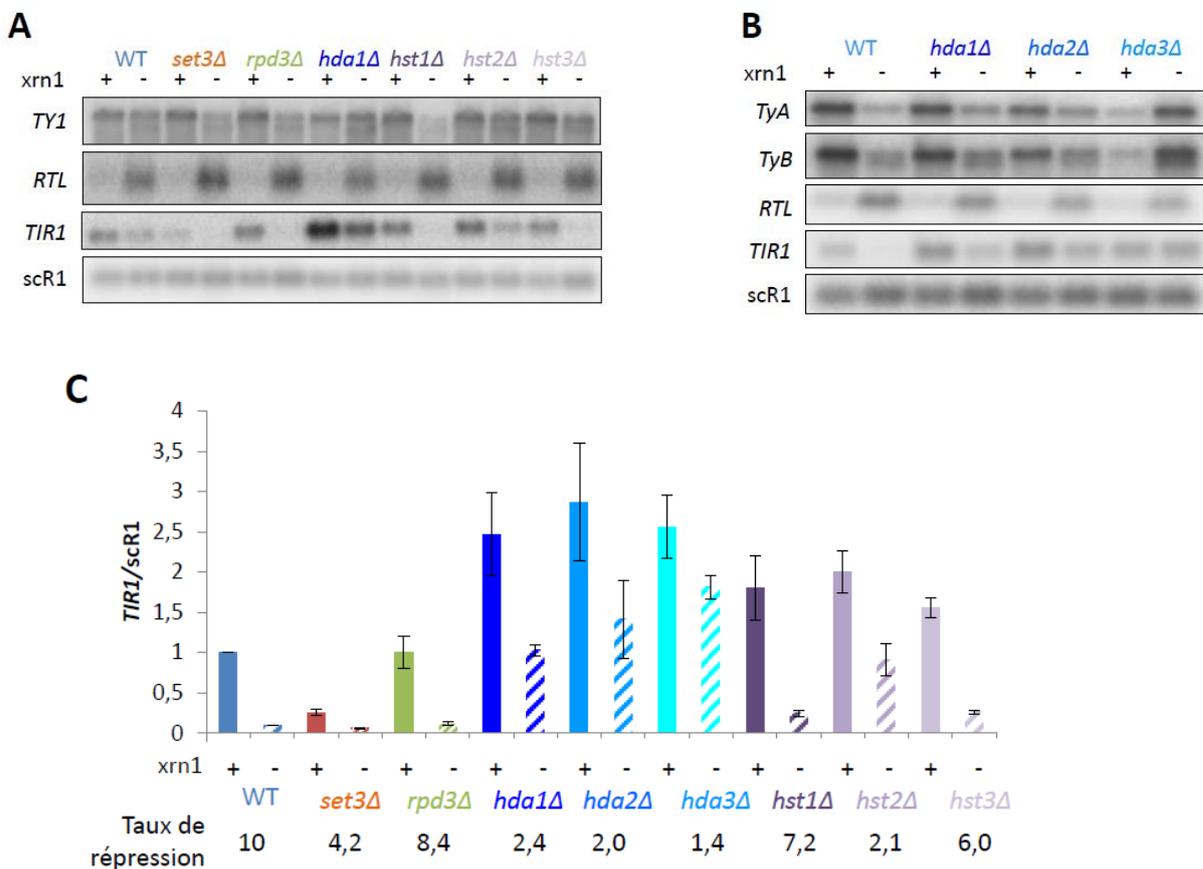


Figure 22 : Histones déacétylases et répression du gène *TIR1* et de *TY1*

A) Northern blot montrant l'effet de Hda1 et Hst1 sur la répression de *TIR1* et de *TY1*.

B) Northern blot montrant l'effet d'une délétion des membres du complexe Hda1 sur la répression de *TIR1*. 100µg d'ARN extraits de cultures des différentes souches de levures ont été déposés sur gel, transférés sur une membrane et révélés avec des amorces spécifiques radioactives.

C) Quantification par RT-PCRq. Les RT sont réalisées en utilisant une amorce spécifique de l'ARN considéré ainsi qu'une amorce spécifique de *scR1*. Les données de PCRq sont normalisées par *scR1*.

Les barres d'erreurs représentent la déviation standard sur des triplicats indépendants.

hst3Δ ont un niveau d'ARNm de *TIR1* proche de celui de la souche sauvage (ligne 3). Les doubles mutants *xrn1Δrpd3Δ* et *xrn1Δhst3Δ* ont quant à eux un niveau d'ARNm de *TIR1* proche de celui de la souche *xrn1Δ*. Ces deux histones déacétylases ne sont donc pas impliquées dans la répression du gène *TIR1*. Pour Set3, les quantités d'ARN observées sont très faibles. Set3 est sans doute un activateur dans la régulation de *TIR1*. Dans le mutant *hst1Δxrn1Δ* la quantité de *TIR1* n'est pas détectable par Northern blot. Hst1 et Xrn1 semblent donc avoir des rôles positifs indépendants. La combinaison des deux mutations réduit considérablement l'expression de *TIR1*. Puisqu'il en est de même pour *TYI* Hst1 est peut être un facteur positif pour tous les gènes contenant un XUT. L'identification des gènes hyper-réprimés par séquençage haut débit dans un mutant *hst1Δxrn1Δ* pourrait permettre d'identifier de manière spectaculaire tous les gènes régulés par des XUT. Dans le mutant *hst2Δ* le niveau d'ARN de *TIR1* semble supérieur à celui de la souche sauvage. De plus, dans le double mutant *xrn1Δhst2Δ* la quantité d'ARN de *TIR1* semble supérieure à celle observée dans la souche *xrn1Δ*. Cependant cette quantité n'égale pas celle du mutant *hst2Δ*. La dérèpression due à la délétion de *HST2* est donc partielle. La délétion du gène *HDA1* a un effet encore plus marqué. Certes la délétion du gène *HDA1* entraîne une forte augmentation de la quantité d'ARNm de *TIR1* par rapport à la souche sauvage mais d'autre part la quantité d'ARNm de *TIR1* dans le double mutant *xrn1Δhda1Δ* est au moins égale à celle observée dans la souche sauvage. La dérèpression de *TIR1* dans ce double mutant semble donc très forte. Afin de confirmer cette impression de manière plus quantitative des expériences de RT-PCRq sur le gène *TIR1* ont été menées.

2. Analyse par RT-PCRq

Contrairement au Northern Blot, la RT-PCRq est une méthode quantitative. Cependant elle ne renseigne pas sur la nature de l'ARN amplifié : en effet ce qui est amplifié ici n'est qu'une région de l'ARNm de *TIR1*. Cette technique ne permet pas de différencier un ARNm mature d'un produit de dégradation. L'approche par RT-PCRq est donc complémentaire de l'approche par Northern Blot. De manière simple, les ARN obtenus sont retrotranscrits en ADN grâce à une transcriptase inverse en utilisant une amorce spécifique du gène *TIR1*. L'ADN ainsi obtenu est quantifié par PCRq. Afin de vérifier l'efficacité de la transcription inverse dans chaque réaction elle est aussi réalisée avec une amorce spécifique de l'ARN *scRI* dont la quantité est stable dans tous les mutants étudiés. Chaque RT-PCRq a été faite en triplicat. Les résultats obtenus sont présentés en figure 22C. Ils sont normalisés

avec les signaux obtenus avec l'amorce de *scR1*, et normalisés par rapport à la souche sauvage dont la valeur est fixée à 1. Le taux de répression est calculé en utilisant le ratio suivant : (*histone déacétylase* Δ)/(*xrn1* Δ *histone déacétylase* Δ) et rend compte de la diminution de la quantité d'ARN de *TIR1* entre le mutant d'histone déacétylase et le double mutant (*histone déacétylase* Δ et *xrn1* Δ). Ainsi, entre la souche sauvage et la souche *xrn1* Δ la quantité d'ARN de *TIR1* est divisée par 10, le taux de répression de *TIR1* est donc de 10. Pour l'histone déacétylase Set3 le taux de répression est de 4,2. Ce taux est plus faible que celui mesuré pour la souche sauvage, il serait légitime de penser qu'il y a dérèglement cependant les niveaux d'ARN mesurés sont trop faibles pour conclure réellement. Pour l'histone déacétylase Rpd3 le taux est de 8,4 et est très proche de celui de la souche sauvage. Rpd3 ne semble pas avoir d'effet sur la répression de *TIR1*, ce qui confirme l'observation par Northern blot. Il en est de même pour les histones déacétylases Hst1 et Hst3 avec des taux de répression respectivement de 7,2 et 6 même s'il semble y avoir un léger effet. En revanche pour Hda1 et Hst2 les taux de répression sont respectivement de 2,4 et 2,1. La dérèglement observée grâce au Northern Blot est donc confirmée par RT-PCRq.

Ces deux approches complémentaires sur les mêmes ARN permettent de tirer une conclusion majeure. Seules deux histones déacétylases, Hda1 et Hst2, semblent impliquées dans la répression de *TY1* par *RTL* puisqu'en leur absence, *TY1* est à nouveau exprimé dans un contexte *xrn1* Δ . De plus, les mêmes histones déacétylases semblent impliquées dans la répression de *TIR1* par son XUT. De manière intéressante, Hda1 a déjà été impliquée dans des régulations faisant intervenir des ARNnc : dans le cas de *PHO84* et *FLO11* (¹⁴¹). Toutefois les mécanismes sont encore totalement inconnus. Afin d'étudier plus précisément le rôle du complexe Hda1 nous avons cherché l'effet de la délétion des autres membres du complexe.

II. Etude du rôle du complexe Hda1 dans la régulation de *TIR1*

La protéine Hda1 fait partie du complexe Hda1. Il s'agit d'un complexe hétérotétramérique. Il est composé de deux protéines Hda1, d'une protéine Hda2 et d'une protéine Hda3. Hda1 porte l'activité enzymatique de déacétylation. Cependant les deux autres sous-unités sont indispensables à l'activité histone déacétylase. La perte de Hda2 ou de Hda3 abolit complètement l'activité du complexe *in vitro*. Nous avons donc voulu savoir si les délétions

de *HDA2* et *HDA3* avaient le même effet que la délétion de *HDA1* afin de confirmer le rôle de ce complexe. Les souches contenant les délétions des gènes *HDA2* et *HDA3* ont été récupérées. Une délétion de *XRNI* a ensuite été réalisée dans ces souches afin d'obtenir les doubles mutants *xrn1Δhda2Δ* et *xrn1Δhda3Δ*. Ces différentes souches ont été mises en culture et les ARN extraits comme précédemment. Des analyses par Northern Blot et par RT-PCRq ont été réalisées.

1. Analyse par Northern Blot

Les résultats du Northern Blot sont présentés dans la figure 22B. Les résultats obtenus pour les souches sauvage et *xrn1Δ* sont identiques à ceux obtenus dans le précédent Northern Blot : la quantité d'ARN de *Ty1* diminue fortement (ligne1) en présence de *RTL* (ligne 2) dans la souche *xrn1Δ*. En ce qui concerne la délétion de *HDA1* le résultat est aussi conforme à ce qui a été préalablement observé même si l'effet semble moins fort ici : la quantité d'ARN de *TY1* dans le mutant *xrn1Δhda1Δ* est plus forte que dans le mutant *xrn1Δ*. Il y a bien dérèpression de *TY1* malgré la délétion de *XRNI* et la présence de *RTL*. Le même phénomène est observé pour la délétion de *HDA2*. Concernant *Hda3* l'effet est encore plus flagrant. En effet la quantité d'ARN de *TY1* dans le double mutant *xrn1Δhda3Δ* est identique à celle observée dans la souche sauvage et ce bien que *RTL* s'accumule fortement. La délétion de *HDA3* entraîne une forte dérèpression de *TY1* quand *XRNI* est délété. *HDA2* et *HDA3* sont donc aussi impliquées dans la répression de *TY1* par *RTL*. Des résultats similaires ont été obtenus pour *TIR1* où l'ARNm de *TIR1* atteint des niveaux comparables à la souche sauvage quand *HDA2* et *HDA3* sont absents dans un contexte *xrn1Δ*. Tous les membres du complexe *Hda1* semblent avoir le même rôle. Afin d'être plus quantitatif des RT-PCRq ont été réalisées.

2. Analyse par RT-PCRq

Les RT-PCRq ont été réalisées de la même manière que précédemment. Les résultats sont présentés dans la figure 22C. Le taux de répression pour la souche sauvage est de 10. Cependant les taux de répression calculés pour *hda1Δ*, *hda2Δ* et *hda3Δ* sont respectivement de 2,4, 2 et 1,4. Il y a donc bien dérèpression de *TIR1* en absence de *XRNI* lorsque chaque membre du complexe *Hda1* est délété.

Les effets des délétions de *HDA1*, *HDA2* et *HDA3* sont globalement les mêmes : le rétrotransposon *TY1* et *TIR1* qui sont normalement réprimés en absence de *XRNI* sont

déréprimés dans les doubles mutants *xrn1Δhda1Δ*, *xrn1Δhda2Δ* et *xrn1Δhda3Δ*. Ces trois protéines sont donc impliquées dans la répression de *Ty1* par *RTL* et de *TIR1* par son XUT. Toutefois le mécanisme d'action de Hda1 dans cette régulation n'est pas encore connu. Par les expériences qui suivent nous caractériserons cette régulation, déterminerons le rôle direct de Hda1 et comprendrons l'activité et le domaine requis pour établir ce silence.

. Hda1 et expression de *TIR1*

I. Rôle de Hda1 dans l'induction de *TIR1*

Nous avons donc décidé de déterminer le rôle de Hda1 lors de l'induction de *TIR1* lors d'un choc thermique pour voir un éventuel lien avec ce genre de régulation. Nous avons ensuite essayé de confirmer l'importance du XUT dans la régulation de *TIR1* dépendant de Hda1. Et enfin nous avons voulu savoir si l'activité histone déacétylase de Hda1 était impliquée. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, *TIR1* est induit par le froid. Cependant le rôle de Hda1 dans cette induction n'est pas caractérisé. Afin de voir l'effet d'une délétion de Hda1 sur l'induction du gène *TIR1* par choc thermique l'expérience suivante a été réalisée. Les souches sauvage, *xrn1Δ*, *hda1Δ* et *xrn1Δhda1Δ* ont été mises en culture en milieu riche jusqu'à ce que la DO_{600} atteigne 0,5. Puis les cultures ont été transférées dans du milieu préalablement refroidi à 10°C. Elles sont incubées à 10°C pendant 5h. Un aliquot de ces cultures est prélevé toutes les heures. Les ARNs sont ensuite extraits dans tous les aliquots. La quantité d'ARN de *TIR1* a ensuite été mesurée par RT-PCRq comme précédemment.

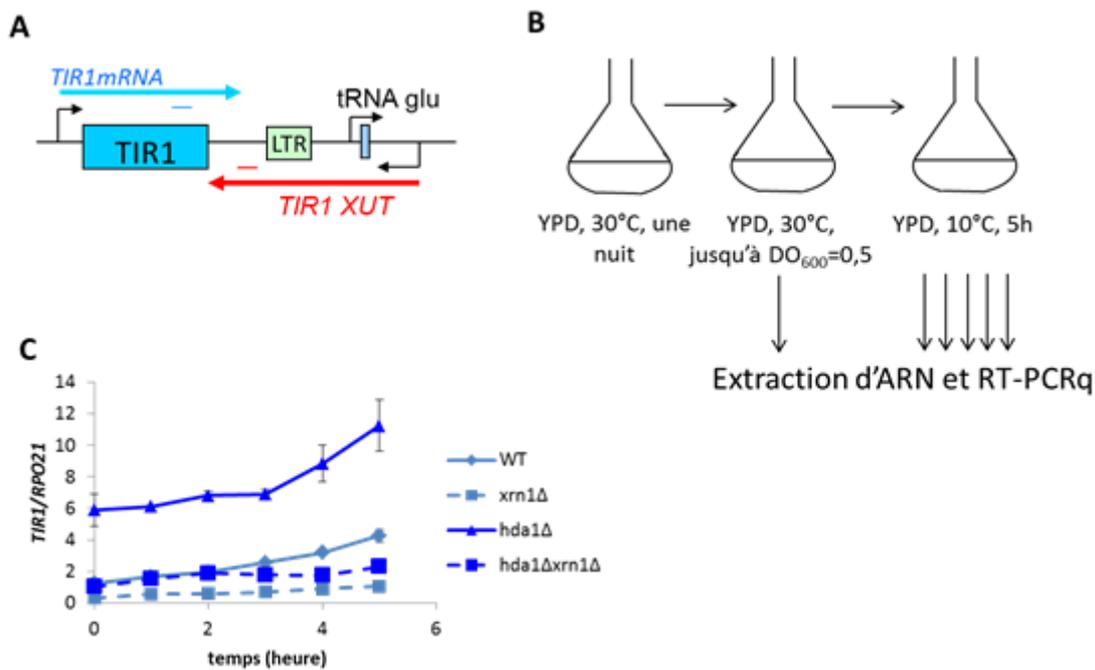


Figure 23 : Expression de *TIR1* après induction à 10°C

A) Schéma du locus de *TIR1*. Les amorces utilisées pour réaliser les transcriptions inverses de *TIR1m* et de *TIR1axut* sont figurées en bleu et rouge respectivement.

B) Protocole utilisé pour étudier l'induction de *TIR1*. Les différentes souches sont cultivées en YPD à 30°C pendant une nuit. Ces cultures sont ensuite diluées pour que la DO_{600} soit de 0,05. Lorsque $DO_{600} = 0,5$ les cultures sont transférées dans du YPD refroidi à 10°C et incubées pendant 5h à 10°C. Des aliquots sont prélevés toutes les heures et les ARN extraits.

C) Quantification de l'ARN de *TIR1* par RT-PCRq. Les souches *xrn1Δ* sont figurées par des traits pointillés.

Les barres d'erreurs représentent la déviation standard sur des triplicats indépendants.

Les résultats obtenus lors de cette expérience sont récapitulés dans la figure 23C. Ils sont normalisés par rapport à la quantité d'ARN du gène *RPO21* dont la quantité ne varie pas. Dans la souche sauvage lors du passage à 10°C la quantité d'ARN de *TIR1* augmente régulièrement pour passer de 1 à 4. Cette quantité double environ toutes les 2,5h. Même si les niveaux de *TIR1* mesurés sont plus faibles l'induction est similaire dans une souche *xrn1Δ*. En effet la quantité d'ARN passe de 0,1 à 0,4. Le temps de doublement de cette ARN est donc aussi de 2,5h. Il faut noter ici que le taux de répression de *TIR1* ne change pas durant cette induction : il est toujours de 10. Bien qu'il y ait induction de *TIR1* la répression de *TIR1* en absence de *XRN1* est toujours efficace. La délétion de *HDA1* semble elle avoir un effet différent. Le niveau d'ARN au moment du choc thermique est plus élevé (6 fois par rapport à la souche sauvage). L'augmentation du niveau d'ARN est très faible pendant les 3 premières

heures d'induction en passant de 6 à 7. Il faudrait environ 12h pour que la quantité d'ARN double. En revanche au bout de 3h l'induction de *TIRI* est similaire à celle observée dans une souche sauvage puisque la quantité d'ARN passe de 7 à 11 en 2h. La quantité d'ARN de *TIRI* double donc de nouveau en 3h. La délétion de *HDA1* entraîne un retard dans l'induction du gène *TIRI*. Ceci est sûrement dû au fait que le niveau de *TIRI* est déjà élevé dans un mutant *hda1Δ*. Le mutant *hda1Δxrn1Δ* a lui aussi un comportement différent. Pendant les 2 premières heures l'induction est normale. Il faut 3h pour doubler le niveau d'ARN de *TIRI*. En revanche au bout de 2h il semblerait que *TIRI* ne soit plus induit puisque le temps de doublement du niveau d'ARN de *TIRI* est de 12h pendant cette phase. Au final le taux de répression pour la délétion de *HDA1* est de 5,5 ce qui correspond au taux de répression à t=0. L'induction est donc normale pendant 2h puis fortement ralentie pendant les 3 heures suivantes pour le mutant *xrn1Δhda1Δ*.

Cette expérience permet de tirer deux conclusions. Premièrement l'absence de *XRNI* a un effet mineur sur la capacité d'induire *TIRI* mais à des niveaux très bas. Deuxièmement, au contraire *Hda1* a un effet sur l'induction de *TIRI*. La simple délétion de *HDA1* induit un retard dans l'induction par choc thermique alors que la double délétion *xrn1Δhda1Δ* n'a pas de retard dans l'initiation de l'induction mais celle-ci est beaucoup moins forte au bout de 2h. *Hda1* est donc impliquée dans la cinétique de réponse du gène *TIRI* suite à un choc thermique.

II. Caractérisation du XUT antisens de *TIRI*

Comme la majorité des XUT celui de *TIRI* est antisens du gène qu'il régule. Cependant les coordonnées précises de ce XUT ne sont pas encore clairement définies. Afin de déterminer plus précisément les limites de ces XUT et de savoir si des ARNnc dépendant de *Hda1* existent à ce locus, la caractérisation des ARN exprimés au niveau du locus *TIRI* a été réalisée. Des ARN sont extraits à partir des souches sauvage, *xrn1Δ*, *hda1Δ* et *xrn1Δhda1Δ* comme décrit précédemment. Des RT-PCRq utilisant différents oligonucléotides ont été réalisées. Ces résultats sont normalisés par le gène *RPO21*. Pour chaque couple de PCRq utilisée les données sont normalisées par rapport au résultat obtenu pour la souche sauvage dont la valeur est fixée à 1. Etant donné que les RT-PCRq ont été réalisées sur des ARN provenant de souches contenant une délétion de *XRNI* et/ou de *HDA1*, des ARN dépendant de *Xrn1* ou de *Hda1* peuvent être identifiés.

1. ARNnc dépendant de Xrn1

Ce type d'ARNnc est déterminé en comparant les ARN communs aux souches *xrn1Δ* et *xrn1Δhda1Δ* avec les ARN de la souche sauvage. Cela revient à comparer les barres hachurées avec la barre bleue claire de la figure 24B. Pour les positions 934 et 1177nt à partir du codon ATG la quantité d'ARN mesurée dans les souches délétées pour *XRN1* est respectivement 8 et 12 fois supérieure à la quantité d'ARN mesurée dans la souche sauvage. Pour la position 594 à partir de l'ATG il n'y a pas d'accumulation d'un ARN dépendant de *XRN1*. *TIR1axut* s'étend donc au moins jusqu'à la position 934 mais pas jusqu'à la position 594. Malheureusement aucun couple n'a fonctionné en PCR entre ces deux positions. La délimitation du XUT de *TIR1* ne peut donc pas être plus précise. Il semble qu'il n'y ait pas de XUT antisens de l'ORF de *TIR1* étant donné qu'aucune accumulation d'ARN de ce type n'est visible pour les positions 58 à 594. Ceci est cohérent avec les données de séquençage au débit (¹²⁵). De la même manière, la quantité d'ARN mesurée pour les positions -200 et -123 est 3 à 4 fois supérieure dans les souches *xrn1Δ* et *xrn1Δhda1Δ* par rapport à la souche sauvage. Il semble donc qu'un petit XUT soit exprimé en antisens du promoteur de *TIR1*. Etant donné qu'un produit de PCRq est de 120nt la taille de ce XUT est donc au minimum de (210-123) + 120 soit 207nt. Ce XUT n'est pas visible dans les données de séquençage haut débit (figure 19A). Etant donné que le XUT identifié ici est très petit il est probable qu'il ait été éliminé lors de la préparation des ARN pour le séquençage.

2. ARNnc dépendant de Hda1 ?

Ce type d'ARN est déterminé en comparant les ARN communs aux souches *hda1Δ* et *xrn1Δhda1Δ* avec les ARN de la souche sauvage. Ceci revient à comparer la barre bleue claire avec les barres bleues foncées de la figure 24B. Pour les positions -458 à -123 et 934 à 1177 il n'y a pas de différence de niveau d'ARN entre la souche sauvage et la souche *hda1Δ*. Il n'y a donc pas d'ARN dépendant de Hda1 dans ces deux régions. En revanche pour la région codante de TIR c'est-à-dire entre 58 et 594nt la quantité d'ARN antisens dans les souches *hda1Δ* et *xrn1Δhda1Δ* est 2 à 3 fois supérieure à la quantité d'ARN dans la souche sauvage. Il semblerait donc qu'il y ait un ARNnc antisens de la région codante de *TIR1* qui est dépendant de *HDA1*. Deux hypothèses permettent d'expliquer ce phénomène : Hda1 pourrait intervenir dans la stabilité des ARN ou Hda1 pourrait intervenir dans la régulation de la transcription pervasive. En effet pour la première hypothèse Hda1 pourrait déstabiliser certains ARNnc. Sa

délétion entraînerait alors une accumulation de ces ARN. En ce qui concerne la 2^{ème} hypothèse Hda1 pourrait empêcher la transcription de débiter en antisens dans les régions codantes. La délétion de *HDA1* provoquerait alors une augmentation de la transcription pervasive et donc l'augmentation de la quantité de ces ARN. Hda1 pourrait aussi intervenir dans la régulation de la terminaison de la transcription pervasive. La délétion de *HDA1* causerait alors un défaut partiel de terminaison de la transcription conduisant à la synthèse d'un *TIR1axut* étendu (figure 24A).

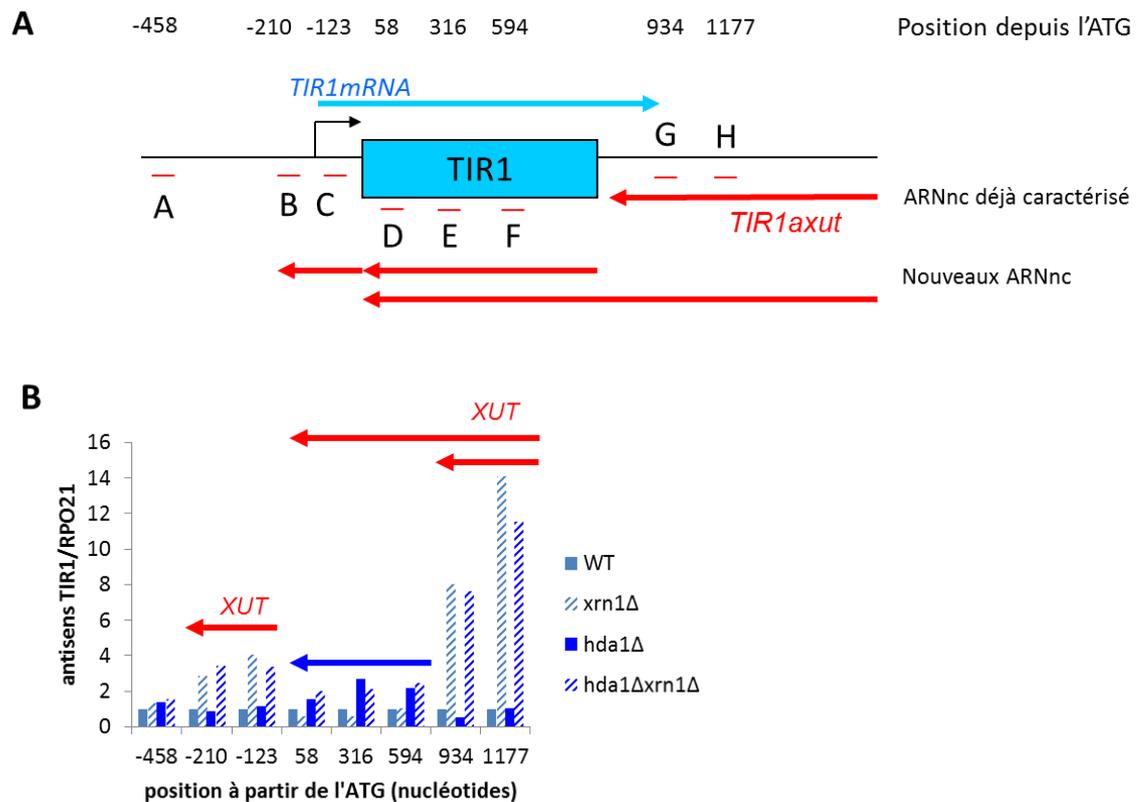


Figure 24 : Etude des ARN antisens au locus de *TIR1*

A) Locus de *TIR1* et amorces utilisées lors des PCRq et ARNnc.

B) RT-PCRq antisens du gène *TIR1*. Les différentes souches sont cultivées en YPD à 30°C jusqu'à $DO_{600} = 0,5$ et les ARN extraits. Des RT-PCRq ont été réalisées en utilisant les amorces présentées en figure 24A. Les résultats sont normalisés avec le gène *RPO21*.

Tous ces résultats ont permis de mettre en évidence 3 ARNnc. Le premier est le XUT déjà connu qui s'étend au moins jusqu'à la position 934 mais pas jusqu'à la position 594. Cet ARN est donc antisens de la région 3' non traduite de l'ARNm de *TIR1*. Le second ARN est aussi un XUT. Celui-ci est très petit et localisé en antisens du promoteur de *TIR1*. Le

troisième est plus hypothétique. Il est localisé en antisens de la région codante de *TIR1* et sa quantité est augmentée en absence de *HDA1*. Cet ARN peut être du à l'initiation de la transcription antisens à partir de l'extrémité 3' de *TIR1* ou à un défaut partiel de la terminaison du *TIR1axut* conduisant à la synthèse d'un ARNnc plus long. Hda1 pourrait intervenir à différents niveaux. Premièrement Hda1 pourrait jouer un rôle dans la terminaison de la transcription pervasive. Deuxièmement Hda1 pourrait intervenir dans l'initiation de la transcription pervasive en contrôlant le positionnement des histones et en masquant ainsi des sites cryptiques de transcription. Troisièmement Hda1 pourrait intervenir dans la stabilité de ces ARN.

Finalelement bien que le mécanisme d'action du *TIR1axut* ne soit pas connu, il ne fait aucun doute sur le fait que *HDA1* réprime *TIR1* en présence ou non de *TIR1axut*. Hda1 étant une histone déacétylase il est possible que le rôle de Hda1 dans la répression de *TIR1* par son XUT soit dû à son activité enzymatique. Nous avons donc décidé d'explorer cette possibilité.

. **Hda1 et acétylation des histones**

Hda1 agit au sein d'un complexe qui déacétyle certaines lysines des histones H2B, H4 et majoritairement H3. Les deux lysines les plus déacétylées par Hda1 sont H3K14 et H3K18. Nous avons donc essayé de trouver un lien entre l'acétylation de ces 2 résidus et la répression de *TIR1* par son XUT.

I. Hda1 et H3K18ac

Si le rôle de Hda1 passe par son activité histone déacétylase, la délétion de Hda1 devrait entraîner une augmentation de l'acétylation des histones H3K14 et H3K18. De plus si l'acétylation de H3K14 et H3K18 sont impliquées dans la répression de *TIR1* en absence de Xrn1, ces acétylations devraient diminuer dans ce mutant. Une immunoprécipitation de chromatine a été réalisée en utilisant en anticorps anti-H3K18ac.

Les résultats de ces immunoprécipitations sont présentés en figure 25. Afin de s'assurer que la quantité de chromatine utilisée était la même pour chaque IP une PCRq a été réalisée sur la chromatine de départ déprotéinée et traitée à la RNase A. La fraction de chromatine immunoprécipitée est calculée ainsi : (chromatine immuno-précipitée – signal

aspécifique)/(chromatine de départ). Etant donné que Hda1 ne déacétyle pas H3K18ac dans la région d'ADN ribosomique cette dernière a été utilisée comme normalisateur interne (²⁹⁸).

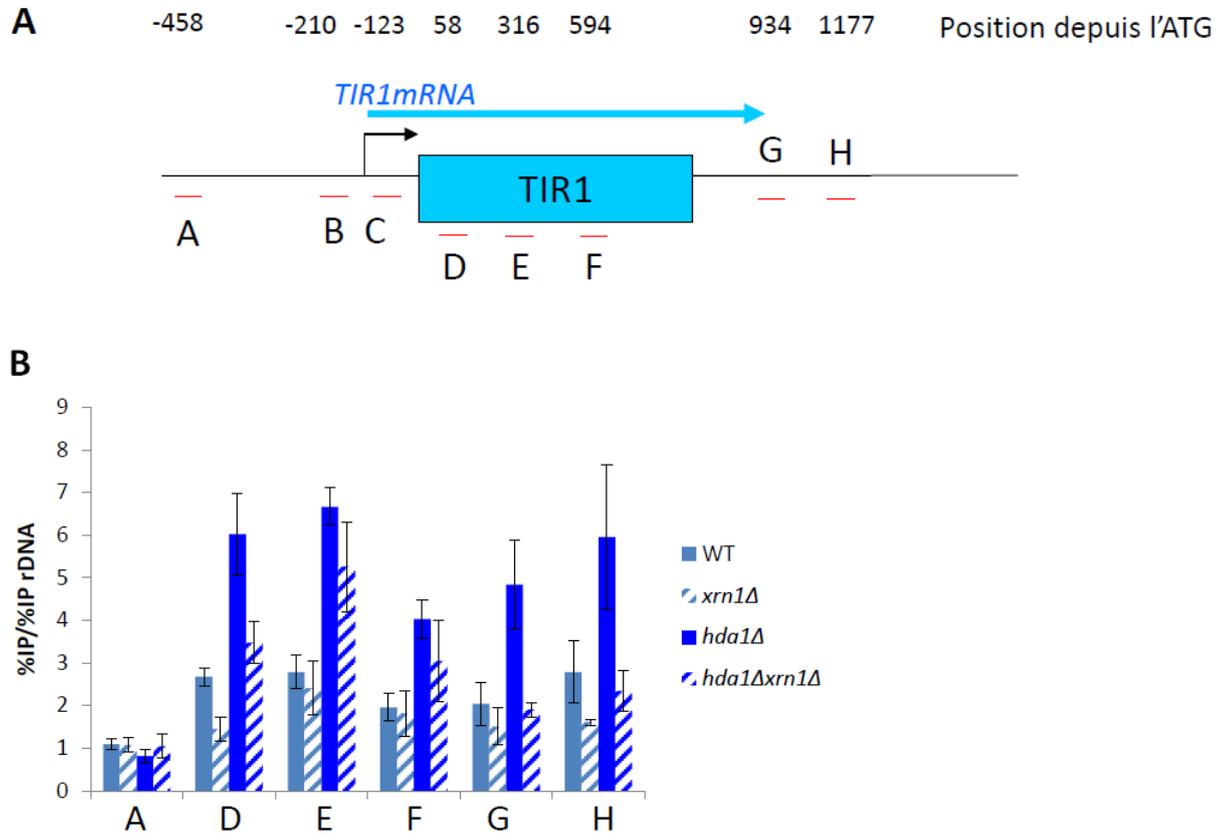


Figure 25 : Acétylation en H3K18 au locus *TIR1*

Les souches sauvage, *xrn1Δ*, *hda1Δ* et *xrn1Δhda1Δ* ont été mises en culture. Lorsque la DO_{600} a atteint 0,5 les cultures ont été cross-linkées avec du formaldéhyde. La chromatine a ensuite été extraite et soniquée de telle sorte que la taille des fragments obtenus soit comprise entre 100 et 500nt. La quantité de protéines contenue dans les différents extraits a été mesurée grâce à un dosage au BCA. 200μg de protéines sont utilisés pour chaque immunoprécipitation. Parallèlement des billes magnétiques ont été incubées avec un anticorps anti-H3K18ac. L'immunoprécipitation est ensuite réalisée comme décrit précédemment sur chaque chromatine. Afin de déterminer le signal aspécifique une immunoprécipitation a été réalisée avec les mêmes billes mais sans anticorps. La quantité d'ADN correspondant à différentes régions de *TIR1* a été mesurée par RT-PCRq et normalisée par la quantité de *RPO21*. B) Résultats de la ChIP anti-H3K18ac. Les courbes bleues claires correspondent aux souches contenant HDA1, les courbes bleues foncées correspondent aux souches contenant *hda1Δ*. Les courbes en trait plein correspondent aux souches contenant XRN1 alors que les courbes en pointillé contiennent *xrn1Δ*. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard sur des triplicats indépendants.

Nous observons que dans une souche sauvage la quantité de H3K18ac est à peu près homogène tout le long du locus de *TIR1*. Toutefois il semble que la quantité de H3K18 soit légèrement supérieure en 5' du gène par rapport à la région 3'. Pour la souche *xrn1Δ* la quantité de H3K18ac en 5' du gène est 2 fois plus faible que pour la souche sauvage. Pour le reste de la région codante la quantité de H3K18ac est identique pour ces deux souches. Dans la souche *hda1Δ* la quantité de H3K18ac est globalement 2 à 3 fois supérieure celle mesurée dans la souche sauvage. Il semble qu'ici aussi H3K18ac soit plus importante en 5' qu'en 3'. Dans la souche *xrn1Δhda1Δ* le niveau de H3K18ac est plus élevé au milieu de la région codante comme dans le mutant *xrn1Δ*. Cependant la quantité de H3K18ac dans ce mutant est en moyenne 3 fois supérieure à celle mesurée dans le mutant *xrn1Δ*.

Cette expérience permet de tirer trois conclusions. Premièrement la délétion de Hda1 provoque systématiquement une augmentation de H3K18ac dans la région codante, Hda1 est donc impliquée dans la déacétylation de la région codante de *TIR1*. Deuxièmement étant donné que le niveau de H3K18ac est plus faible dans le mutant *xrn1Δ* par rapport à la souche sauvage au tout début de la région codante, l'activité de Hda1 n'est donc impliquée qu'en 5' lors de l'extinction du gène. Troisièmement puisque le niveau de H3K18ac dans le mutant *xrn1Δhda1Δ* est toujours inférieur à celui du mutant *hda1Δ*, il est possible qu'une autre histone déacétylase soit impliquée dans la déacétylation de la région codante de *TIR1*. Cette histone déacétylase pourrait être Hst2 comme suggéré précédemment.

II. Importance de H3K14 et H3K18 dans la régulation de *TIR1*

La délétion de *HDA1* entraîne une augmentation de l'acétylation en H3K18 sur le gène *TIR1*. Cependant la délétion de *XRNI* n'entraîne que peu de variation de l'acétylation H3K18 au niveau de la région codante de *TIR1*. Afin de tester si l'acétylation joue vraiment un rôle dans la répression de *TIR1* par son XUT des mutants ponctuels d'histones ont été étudiés.

Trois différentes mutations ponctuelles ont été utilisées. Elles touchent les lysines K14 et K18 de l'histone H3. Chez la levure, il existe deux régions codant pour les histones H3 et H4. Dans les souches portant ces mutations ponctuelles, un des deux loci est délété. L'autre est remplacé par une copie portant la mutation ponctuelle considérée, intégrée au génome (³⁵⁴). La première mutation ponctuelle change la lysine en alanine. Les mutants portant cette

mutation seront respectivement appelés H3K14A et H3K18A. L'alanine est un acide aminé apolaire qui ne peut pas être acétylé. Ces mutants miment donc une hypoacétylation ou une hyperactivité de Hda1. Cependant, cette mutation change une lysine qui est polaire en un acide aminé apolaire. Les propriétés de ces deux acides aminés sont différentes et les éventuels effets de cette mutation pourraient être imputés au changement de nature de l'acide aminé. Afin de contourner ce problème, nous avons aussi utilisé la mutation ponctuelle qui remplace les lysines H3K14 et H3K18 par des arginines qui sont polaires et chargées à pH physiologique donc très proches des lysines mais impossible à acétyler. Ces mutations seront notées H3K14R et H3K18R. Nous disposons donc de deux mutants supprimant l'acétylation sur une lysine. Nous avons aussi utilisé une mutation ponctuelle qui remplace la lysine par une glutamine mimant une lysine acétylée. Les mutations H3K14Q et H3K18Q sont donc représentatives d'une acétylation constitutive de la lysine H3K14 ou H3K18, équivalent à une mutation de Hda1. *XRN1* a été délété dans chacune de ces souches. Malheureusement, la mutation H3K18Q n'a pas pu être obtenue. Toutes les souches portant les mutations ponctuelles avec ou sans le gène *XRN1* ont été mises en culture et les ARN extraits comme précédemment. Des RT-PCRq ont été réalisées avec des amorces spécifiques permettant de détecter l'ARNm de *TIR1*. Les résultats ont été normalisés avec le gène *RPO21* qui a aussi été rétrotranscrit en même temps que l'ARNm de *TIR1*.

1. Vérification de la fonctionnalité de H3K14Q

Nous avons tout d'abord voulu vérifier si la mutation H3K14Q mimait bien une acétylation constitutive. Pour cela nous avons regardé le niveau d'expression du gène *CYC7* qui est un gène qui est surexprimé dans un mutant *hda1Δ* ce qui entraîne une hyperacétylation en H3K14 (³⁴⁷). Les résultats sont présentés en figure 26A. Les données sont normalisées par rapport à la valeur de la souche sauvage qui est arbitrairement fixée à 1. La quantité d'ARNm de *CYC7* dans la souche H3K14A est très proche de celle de la souche sauvage. Si l'acétylation est bien un facteur, activateur alors la quantité d'ARN devrait être plus faible. Cependant *CYC7* est un gène induit en condition anaérobie. Il est donc réprimé dans les conditions de culture utilisées. La mutation H3K14A n'apporte pas de niveau de répression supplémentaire. En revanche dans le mutant H3K14Q la quantité d'ARNm est 12 fois supérieure à celle de la souche sauvage. Cette mutation mime donc bien une acétylation constitutive de H3K14.

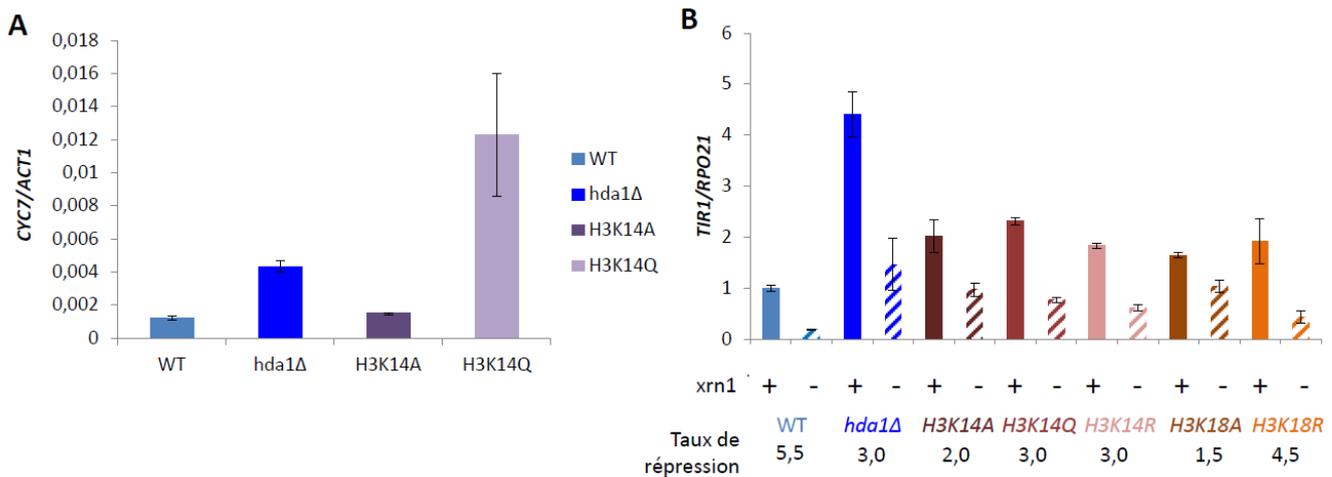


Figure 26 : Mutations ponctuelles d'histones et expression de *TIR1*

A) RT-PCRq sur le gène *CYC7*. Les différentes souches sont cultivées en YPD à 30°C jusqu'à $DO_{600}=0,5$ et les ARN extraits. Des RT ont été réalisées en utilisant une amorce poly dT. Les résultats sont normalisés avec le gène *PGK1*.

B) RT-PCRq sur le gène *TIR1*. Les différentes souches sont cultivées en YPD à 30°C jusqu'à $DO_{600}=0,5$ et les ARN extraits. Des RT ont été réalisées en utilisant les amorces présentées spécifiques de *TIR1* et *RPO21*. Les résultats sont normalisés avec le gène *RPO21*.

Les barres d'erreurs représentent la déviation standard sur des triplicats indépendants.

2. Effet des mutations ponctuelles sur la répression de *TIR1*

Les effets des différentes mutations ponctuelles ont ensuite été observés sur le gène *TIR1*. Les résultats sont présentés en figure 26B. Comme pour les autres analyses de RT-PCRq, les résultats sont normalisés par rapport à la souche sauvage dont la valeur est fixée à 1. Le taux de répression est de 5,5. Pour la souche *hda1Δ* le taux de répression est de 3. De plus la quantité d'ARNm de *TIR1* dans la souche *xrn1Δhda1Δ* est identique à celle de la souche sauvage. La délétion de *HDA1* entraîne bien une dérèpression de *TIR1* dans ce fond génétique aussi. Comme attendu la mutation H3K14Q cause bien une augmentation de la quantité d'ARNm de *TIR1*. De plus lorsque *XRN1* est délété le taux de répression de *TIR1* est de 3. L'acétylation de H3K14 pourrait donc être impliquée dans la répression de *TIR1* par son XUT. Cependant pour les mutations H3K14A et H3K18A les taux de répression sont respectivement de 2 et 1,5. La dérèpression observée est encore plus forte que pour la mutation *hda1Δ*. Or si l'acétylation est bien un facteur activateur la mutation K→A qui provoque une perte de l'acétylation ne devrait pas induire de dérèpression.

Dans le mutant H3K14R le taux de répression est de 3,0. Une dérèpression est toujours observée. Or H3K14R mime une déacétylation constitutive. Si l'acétylation était responsable de la dérèpression alors *TIRI* devrait être correctement réprimé. L'acétylation de H3K14 dans un mutant *hda1Δ* n'est donc pas directement responsable de la dérèpression de *TIRI*. La situation est légèrement différente pour la mutation H3K18R. Pour ce mutant le taux de répression est de 4,5. *TIRI* est donc presque correctement réprimé avec une telle mutation. De manière intéressante le remplacement de la lysine par une alanine entraînait une forte dérèpression de *TIRI* dans un contexte *xrn1Δ*. Il est donc possible qu'un résidu polaire en H3K18 soit nécessaire à l'établissement de la répression de *TIRI* dans un mutant *xrn1Δ*. Il est aussi intéressant de noter que dans tous ces mutants ponctuels qui contiennent XRN1 la quantité d'ARNm de *TIRI* est plus élevée que dans la souche sauvage. Il existe donc bien un lien entre H3K14/H3K18 et l'expression de *TIRI*.

Cette expérience permet de tirer 3 conclusions majeures. Premièrement les acides aminés H3K14 et H3K18 sont très importants pour la régulation de *TIRI* que ce soit en présence ou en absence du *TIRIaxut* puisque leur remplacement entraîne une augmentation de la quantité de *TIRI*. Deuxièmement la présence d'un résidu polaire (arginine ou glutamine) à la place d'une lysine semble associée à une dérèpression moins forte que dans le cas d'une alanine. La présence d'un résidu polaire en H3K14 et H3K18 pourrait être requise pour que *TIRI* soit réprimé dans un mutant *xrn1Δ*. Et troisièmement la conclusion la plus importante : l'acétylation en H3K14 et H3K18 n'est pas directement impliquée dans la répression de *TIRI* dans un mutant *xrn1Δ*. En effet une mutation qui empêche toute acétylation provoque le même résultat qu'une mutation qui mime une acétylation constitutive pour la position H3K14. En outre, pour la position H3K18 deux mutations qui causaient une déacétylation constitutive donnent des résultats opposés. La présence d'un résidu apolaire à la place de la lysine en H3K18 est corrélée à une dérèpression très forte de *TIRI* alors qu'un résidu apolaire est associé à une répression normale. Un résidu polaire semble donc nécessaire en H3K18 pour que la répression de *TIRI* dans un mutant *xrn1Δ* soit efficace. Dans un mutant *hda1Δ*, l'hyperacétylation en H3K18 n'autoriserait plus la présence de lysine non modifiée post-traductionnellement en H3K18, entraînant ainsi une absence de répression de *TIRI*. En effet il se peut que l'hyperacétylation de H3K18 empêche la fixation d'un facteur répresseur qui se fixerait plutôt à une lysine non acétylée ou du moins à un résidu polaire. Cette conclusion pose question par rapport au rôle exact de Hda1 dans la répression de *TIRI*. Hda1 pourrait déacétyler les histones et ainsi permettre la fixation d'un répresseur en absence de *XRN1*.

Mais Hda1 pourrait être impliquée via une activité autre qu'histone déacétylase. Il se peut aussi qu'aucune activité enzymatique de Hda1 ne soit nécessaire mais que seule sa présence soit requise. Afin de tester cette dernière possibilité nous avons essayé d'identifier les parties de Hda1 nécessaires à la répression de *TIR1* en présence de son XUT.

. Rôle des domaines de Hda1

I. Structure de Hda1

La protéine Hda1 possède une structure contenant 2 motifs connus. La partie N-terminale contient le domaine catalytique de Hda1. Ce domaine permet aussi l'interaction avec Hda1, Hda2 et Hda3. La partie C-terminale de la protéine contient un motif Arb2. Arb2 est une protéine de *Schizosaccharomyces pombe*. Elle appartient au complexe ARC qui contient une protéine Argonaute. Quand Argonaute interagit avec Arb2 elle fixe préférentiellement des ARNdb. Le motif Arb2 est donc un intermédiaire impliqué dans l'interaction avec des ARNdb.

II. Effet de la troncation de Hda1 sur l'expression de *TIR1*

Etant donné que Hda1 possède un domaine qui est indirectement impliqué dans la reconnaissance d'ARNdb chez *Schizosaccharomyces pombe* cette protéine pourrait aussi être impliquée dans la reconnaissance d'ARNdb (⁵⁰). Ainsi Hda1 pourrait faire le lien entre les ARNnc et leur cible. Afin de tester cette hypothèse nous avons réalisé différentes troncations de la protéine Hda1 afin de tester le rôle du domaine Arb2.

Afin de tester le potentiel rôle du domaine Arb2 dans la régulation de *TIR1* en présence du XUT, plusieurs troncations de la protéine ont été réalisées. La construction 1, appelée *hda1Δ1*, enlève les 306 derniers acides aminés soit la totalité du motif Arb2. La construction 2, appelée *hda1Δ2*, enlève les 106 derniers acides aminés soit une élimination des acides aminés situés après le domaine Arb2. Les constructions 3 et 4, appelées *hda1Δ3* et *hda1Δ4*, enlèvent respectivement 56 et 26 acides aminés dans la partie C-terminale qui ne contient pas de domaines connus. Afin de vérifier le niveau d'expression de la protéine recombinante, un tag MYC a été ajouté. Les séquences des gènes recombinants ont été vérifiées par séquençage puis par Western Blot. Une fois les troncations vérifiées une délétion

de *XRN1* a été réalisée dans les différentes souches. Les souches sauvage, *hda1Δ*, *Hda1-Myc*, *Hda1Δ1-Myc*, *Hda1Δ2-Myc*, *Hda1Δ3-Myc* et *Hda1Δ4-Myc* avec ou sans le gène *XRN1* ont été mises en culture et les ARN extraits comme décrit précédemment. Des analyses par Northern Blot et par RT-PCRq ont été réalisées.

1. Vérification des tronctions par Western Blot

Même si la justesse des constructions et l'absence de mutations ont été vérifiées par séquençage, il reste à savoir si les protéines étaient correctement exprimées. Un Western Blot a été réalisé à partir d'extrait protéique provenant des souches contenant les différentes tronctions. La présence des protéines tronquées est mise en évidence avec un anticorps anti-Myc. La quantité de protéines chargée sur le gel et transférée sur la membrane a été contrôlée grâce à un anticorps anti-ATPase vacuolaire. Le résultat est présenté en figure 27A. Le poids moléculaire du signal observé correspond dans chaque cas au poids moléculaire attendu. De plus l'intensité des différents signaux semble indiquer que les différentes tronctions sont exprimées de la même manière, même si leur niveau d'expression est légèrement plus faible que pour *Hda1-Myc*.

2. Effet des tronctions sur l'expression du XUT

Afin de savoir si les différentes tronctions influent sur l'activité histone déacétylase, un Western Blot a été réalisé en utilisant un anticorps anti-H3K18ac. La quantité de protéines chargée sur le gel et transférée sur la membrane a été contrôlée grâce à un anticorps anti-histone H3. Sans surprise le signal observé correspondant à H3K18ac pour la souche *hda1Δ* est plus intense que pour la souche sauvage. Pour les souches sauvage et *Hda1-Myc* le niveau

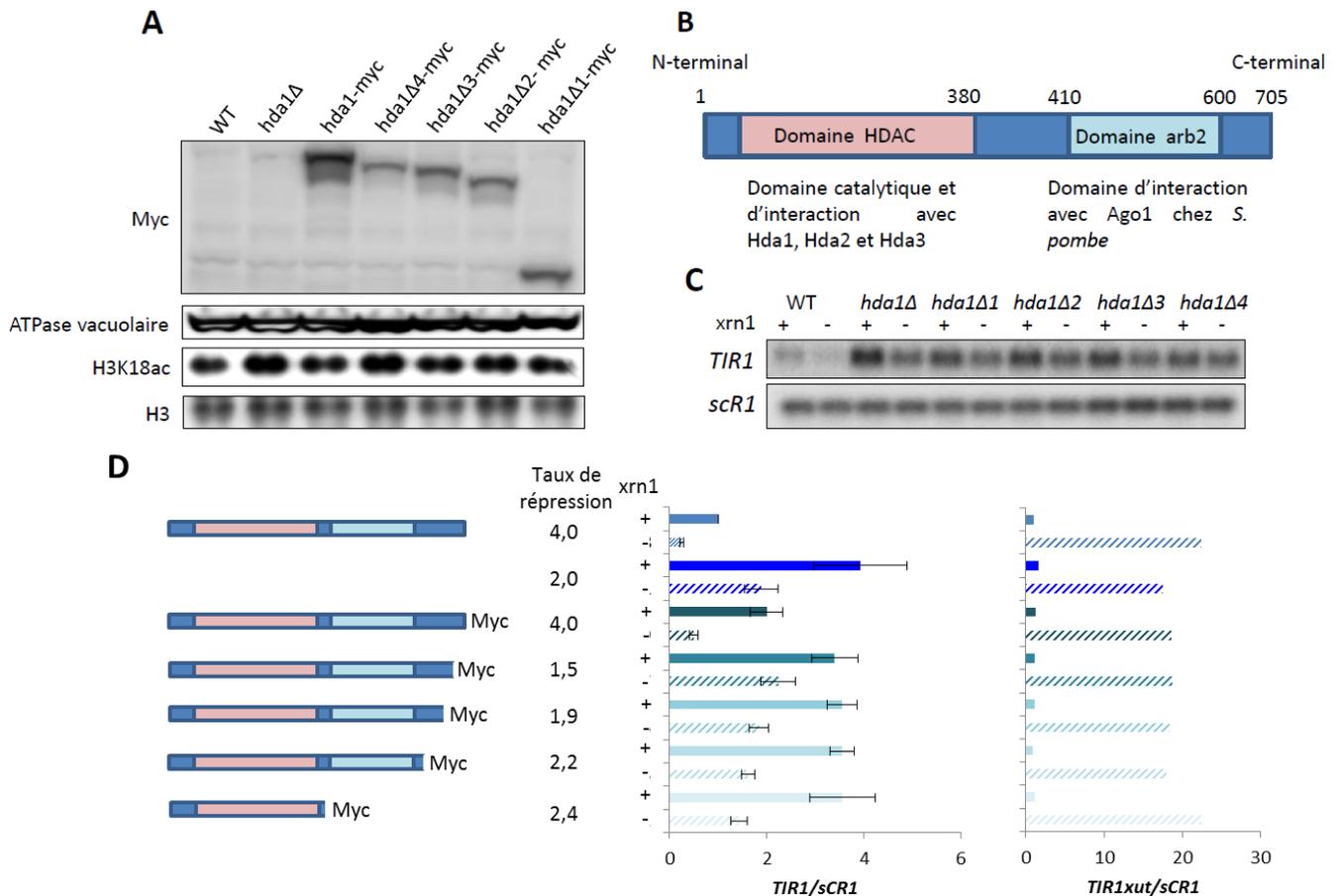


Figure 27 : Troncation de Hda1 et expression de *TIR1*

A) Western blot révélant les différentes troncations de Hda1 construites ainsi que le niveau global d'acétylation pour les différentes troncations. Le blot du haut révèle la présence de l'étiquette Myc. Le blot en dessous révèle la présence de l'ATPase vacuolaire qui sert de contrôle de charge. Le troisième blot révèle la présence de H3K18ac. Le dernier blot sert de contrôle de charge pour les histones.

B) Représentation schématique de Hda1. Le domaine rose représente le domaine catalytique, le domaine bleu ciel le domaine arb2.

C) Northern blot sur *TIR1*. Les ARN des différentes souches sont déposés sur gel, transférés sur une membrane et révélés par une sonde marquée radioactivement spécifique de *TIR1*. *scR1* sert de contrôle de charge.

D) Représentation schématique des différentes troncations construites. Le graphe de gauche est une quantification par RT-PCRq de l'ARN de *TIR1* dans les différents mutant, celui de droite la quantité de *TIR1axut*. Ces résultats sont normalisés par rapport à *scR1*. Le taux de répression est calculé comme suit : (q ARN troncation/q ARN troncation *xrn1Δ*).

de H3K18ac est similaire indiquant que l'étiquette Myc ne perturbe pas globalement l'activité histone déacétylase. L'intensité de la bande correspondant à H3K18ac pour la troncation *hda1Δ1-Myc* est identique à celle observée pour le mutant *hda1Δ*. Ceci peut partiellement s'expliquer par une quantité de Hda1 plus faible que dans la souche Hda1-Myc. Mais il est

très probable que l'activité de cette protéine tronquée soit perturbée même si la troncation est très petite. Pour les troncations *hda1Δ2-Myc*, *hda1Δ3-Myc* et *hda1Δ4-Myc* le niveau de H3K18ac est identique à celui de la souche sauvage. L'activité enzymatique ne semble donc pas perturbée pour ces mutants.

3. Effet des troncations sur la répression de *TIR1*

a. Analyse par Northern Blot

Les ARN extraits à partir des souches citées en G)II)2) ont été utilisés pour faire un Northern Blot. La présence de *TIR1* est évaluée grâce à une sonde radioactive spécifique de l'ARNm de *TIR1*. La quantité d'ARN chargée sur le gel et transférée sur la membrane est contrôlée grâce au marquage de *scR1*. La répression de *TIR1* en absence de *XRN1* est toujours visible (piste 1 et 2, figure 27C). L'effet de dérèglement dans la souche *xrn1Δhda1Δ* est aussi toujours visible (piste 3 et 4). Pour toutes les troncations testées la quantité d'ARN de *TIR1* est similaire à celle observée dans la souche *hda1Δ*. De plus dans les doubles mutants *xrn1Δhda1* tronquée la quantité d'ARN de *TIR1* est la même que pour la souche *xrn1Δhda1Δ*. De manière exceptionnelle toutes les troncations se comportent exactement comme une délétion de *HDA1* suggérant que la partie C-terminale de Hda1 est requise pour la régulation.

b. Analyse par RT-PCRq

Complémentairement à l'analyse par Northern Blot, les mêmes ARN ont été utilisés pour faire une mesure précise de la quantité d'ARN de *TIR1*. Les RT-PCRq ont été normalisées par l'ARN *scR1* ainsi que la quantité d'ARN de *TIR1* de la souche sauvage (figure 27D). Le taux de répression pour la souche sauvage est de 4. La même valeur est obtenue pour la souche Hda1-Myc confirmant l'innocuité de l'étiquette Myc. Pour la délétion de Hda1 et toutes les troncations, le taux de répression est compris entre 1,5 et 2,4 confirmant l'impression dégagée par le Northern blot : toutes les troncations se comportent comme une délétion. Bien que ceci puisse être expliqué par un défaut d'acétylation globale pour *hda1Δ1*, il est clair que ce n'est pas le cas pour les trois autres troncations. Il est aussi intéressant de noter que plus la troncation est courte plus l'effet de dérèglement est fort.

Afin de s'assurer que les dérèglements de *TIR1* ne sont pas dues à une diminution de la quantité de *TIR1axut* celle-ci a été mesurée par RT-PCRq. Les résultats sont présentés dans la figure 27D. Dans toutes les souches qui expriment Xrn1 la quantité de *TIR1axut* est

toujours la même. En revanche pour toutes les souches *xrn1Δ* la quantité de *TIRIaxut* est 18 à 22 fois supérieure. La stabilisation de *TIRIaxut* est identique dans toutes ces souches. Les effets vus dans les mutants de troncation de Hda1 ne sont donc pas dus à des variations de quantité de XUT.

Les troncations de Hda1 permettent de tirer deux enseignements importants. Premièrement toutes les troncations se comportent comme une délétion de *HDA1* et ce bien que les protéines tronquées ne semblent pas être affectées pour leur activité histone déacétylase au niveau global. Deuxièmement, plus les troncations sont petites et plus l'effet de dérèglement de *TIRI* est fort. Ceci montre bien l'importance capitale de la partie C-terminale de Hda1 et pas seulement du domaine Arb2. Toutefois il se peut que même les petites troncations perturbent le repliement et donc la fonction du domaine Arb2. Même s'il est clair que ces troncations dérèglent le gène *TIRI*, il reste à savoir si ceci est dû à une variation de l'acétylation H3K18 ou à un changement de localisation de Hda1.

III. Effet des troncations de Hda1 sur l'acétylation H3K18

Nous avons établi que les troncations du domaine C-terminal de Hda1 entraînent une dérèglement de *TIRI* bien que son activité catalytique ne soit pas changée. Nous avons aussi établi qu'une délétion de Hda1 provoque une hyperacétylation de la région codante de *TIRI*. Etant donné que les troncations de Hda1 semblent avoir le même effet qu'une délétion de Hda1 nous avons voulu voir si la région codante de *TIRI* était hyperacétylée dans les souches contenant les troncations de Hda1. Afin de répondre à cette question une immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée en utilisant un anticorps anti-H3K18ac. Les souches sauvage, *hda1Δ*, *hda1-Myc*, *hda1Δ1-Myc*, *hda1Δ2-Myc*, *hda1Δ3-Myc* et *hda1Δ4-Myc* ont été mises en culture et cross-linkées comme décrit précédemment. La chromatine a ensuite été extraite et soniquée de telle sorte que les fragments d'ADN aient une taille comprise entre 100 et 500nt. L'immuno-précipitation a ensuite été réalisée comme précédemment décrit. La chromatine récupérée suite à l'immunoprécipitation est purifiée et la quantité d'ADN récupérée est quantifiée par PCRq.

Les résultats obtenus par PCRq ont été normalisés par la valeur obtenue pour la région d'ADN ribosomique. Les résultats sont présentés en figure 28. Les différentes troncations sont représentées en dégradé de bleu. Le niveau de H3K18ac dans la souche sauvage est

faible et homogène similaire à celui de la souche Hda1-Myc. Pour la délétion et toutes les tronctions le niveau de H3K18ac est au moins 5 fois supérieur. Les tronctions de Hda1 ont toutes le même effet en ce qui concerne l'acétylation du locus *TIR1*. En regardant plus précisément nous observons que les souches *hda1Δ*, *hda1Δ1-Myc* et *hda1Δ3-Myc* ont le même niveau de H3K18ac. Les souches *hda1Δ1-Myc* et *hda1Δ1-Myc* ont un niveau d'acétylation légèrement plus faible.

Cette immunoprécipitation de la chromatine utilisant un anticorps H3K18ac amène deux conclusions. La première est que l'étiquette Myc ne perturbe pas le rôle de Hda1 au niveau du locus de *TIR1*. La seconde est que les tronctions ont globalement toutes le même effet : elles entraînent une hyperacétylation du locus *TIR1* tout comme la délétion de *HDA1*. Pourtant la quantité globale de H3K18ac dans les cellules change peu comme l'atteste la figure 27A.

Il semblerait donc que l'activité de Hda1 sur le locus de *TIR1* soit dépendante du domaine C-terminal. Dans la mesure où le niveau global d'acétylation n'est pas affecté, deux hypothèses sont à explorer : soit le recrutement de Hda1 sur *TIR1* dépend de ce domaine, soit son activité est directement contrôlée sur *TIR1* par ce domaine C-terminal.

Cette expérience permet de tirer deux conclusions importantes. Premièrement, bien que Hda1 tronquée soit toujours présente au niveau de *TIR1* le niveau de H3K18ac est plus élevé que dans une souche sauvage. L'activité histone déacétylase doit nécessairement être diminuée lorsque Hda1 est tronquée. La partie tronquée interviendrait alors dans la régulation de l'activité histone déacétylase. Deuxièmement il semble que Hda1 déacétyle le locus *TIR1* de manière continue que ce soit avec ou sans *XRNI*. Ceci est compatible avec la localisation de Hda1 qui ne change pas en présence ou en absence de *XRNI*. Or nous avons montré qu'il fallait H3K14 et H3K18 sans acétylation pour que le gène *TIR1* soit réprimé. La déacétylation rendrait donc le gène sensible à l'action du XUT. Selon cette hypothèse Hda1 serait impliquée dans l'établissement de la répression mais pas dans son maintien. En absence de Hda1 les histones seraient hyperacétylées et ainsi non accessibles à un effecteur qui initierait la répression de *TIR1*. Lorsque Hda1 est tronquée, elle n'est plus présente au niveau de *TIR1*, les histones ne sont alors plus déacétylées : le gène n'est plus réprimé efficacement. Le domaine tronqué interviendrait aussi dans la localisation de *TIR1* lorsque le XUT est stabilisé et donc quand potentiellement des ARNdb sont formés. Cependant toutes les analyses faites jusqu'à présent n'ont été réalisées que sur des quantités d'ARN à l'équilibre. En effet la quantité

d'ARN dans une cellule est la résultante de la synthèse et de la dégradation. Afin de comprendre le mécanisme par lequel Hda1 agit sur la quantité d'ARN de *TIR1* nous avons étudié l'effet de Hda1 sur la synthèse et la dégradation de cet ARN.

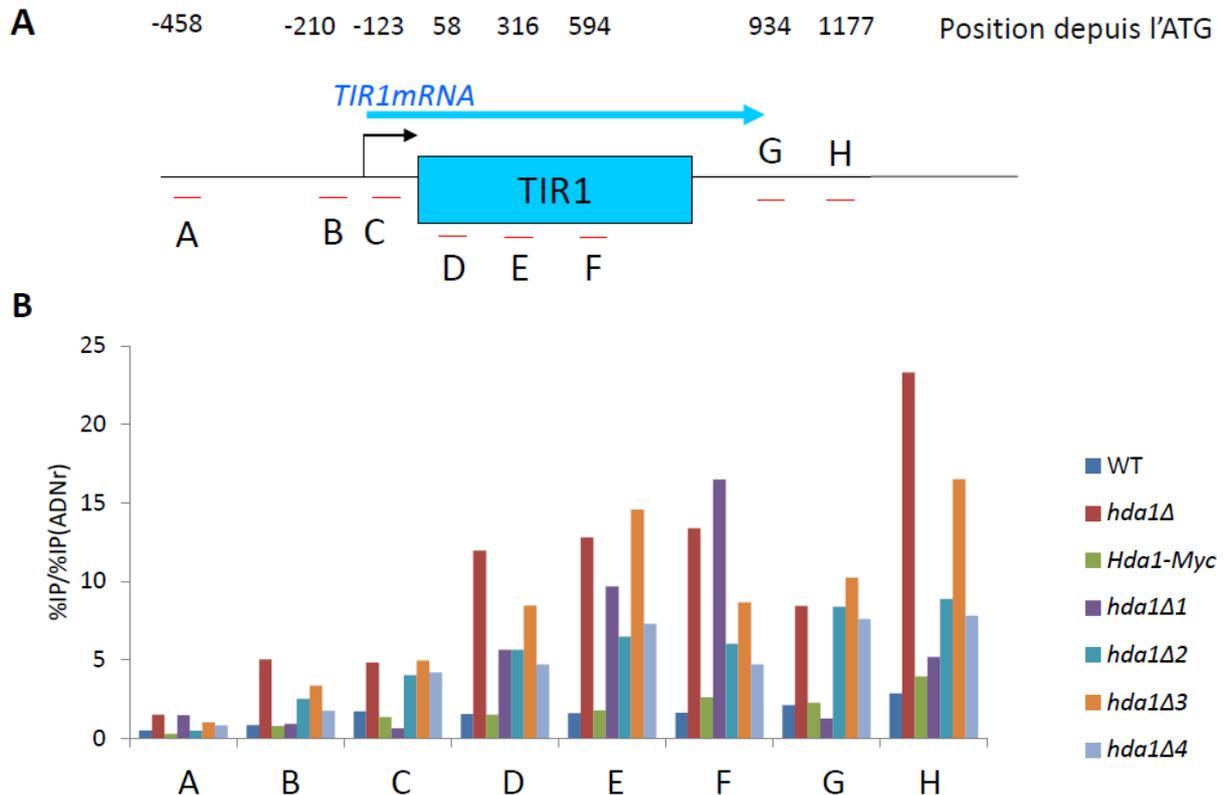


Figure 28 : Troncation de Hda1 et H3K18ac au locus de *TIR1*

A) Localisation des amorces utilisées pour la PCRq.

B) ChIP anti-H3K18ac. La ChIP est réalisée comme précédemment pour les souches sauvages pour *XRN1* et *xrn1Δ* respectivement. Les données sont normalisées par rapport à la région d'ADNr.

IV. Effet des troncations sur la localisation de Hda1

1. Localisation de Hda1 en absence du XUT

Les troncations de Hda1 causent une augmentation de H3K18ac au niveau du gène *TIR1* tout comme la délétion de Hda1. Ceci pourrait s'expliquer par une perte d'activité de Hda1 tronquée au niveau du gène *TIR1* mais aussi par un problème de recrutement de Hda1 tronquée au niveau de *TIR1*. Afin de trancher entre ces deux hypothèses nous avons tiré parti

de la présence de l'étiquette Myc sur les différentes Hda1 tronquées. Une immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée contre l'étiquette Myc. Elle a été réalisée comme précédemment. Etant donné qu'il n'est pas possible d'anticiper l'effet de la troncation de Hda1 sur sa localisation nous n'avons pas réussi à définir un normalisateur. Les résultats de la figure 29 sont donc les données brutes obtenues après PCRq.

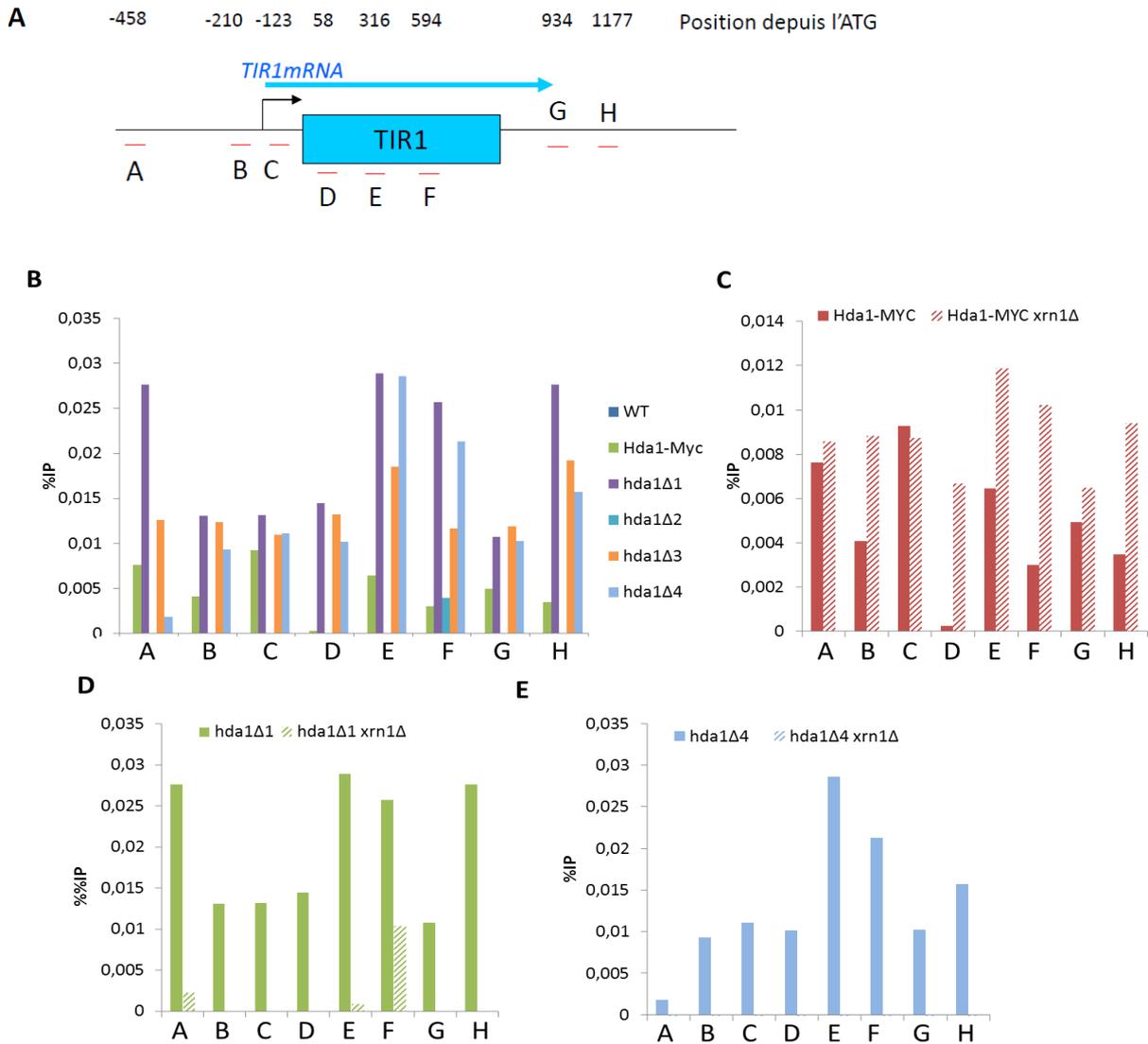


Figure 29 : Troncation de Hda1 et présence de Hda1 au locus de *TIR1*

ChIP anti-Myc. La ChIP est réalisée comme précédemment. Les données ne sont pas normalisées.

A) Représentation schématique du locus *TIR1*.

B) Localisation des différentes troncations de Hda1 au locus de *TIR1*.

C), D) et E) comparaison de la localisation de Hda1-Myc, *hda1Δ1* et *hda1Δ4* respectivement en fonction du contexte *xrn1Δ*.

Les barres hachurées correspondent aux mutants *xrn1Δ*.

Dans la souche sauvage l'efficacité d'immunoprécipitation est nulle ce qui est conforme à l'absence d'étiquette Myc dans cette souche. La quantité de Hda1-Myc est faible tout au long du gène *TIR1*. Hda1 est présente en faible quantité au niveau de ce gène en présence de *XRNI*. Pour la troncation *hda1Δ2* l'efficacité d'immunoprécipitation est nulle. Il se peut aussi que dans cette souche l'étiquette Myc ne soit pas accessible à l'anticorps. Les trois autres troncations de Hda1 sont bien présentes au niveau du gène *TIR1*. Leur densité semble même en moyenne 4 fois plus forte que pour la souche Hda1-Myc.

Cette expérience permet de favoriser une des deux hypothèses de départ. Etant donné que les différentes troncations de Hda1 au niveau du gène *TIR1* sont toutes présentes à l'exception de *hda1Δ2*, il semblerait que l'hyperacétylation de H3K18 soit donc due à un défaut d'activité de Hda1 tronquée en C-terminale et ce de manière restreinte à *TIR1*. L'activité de Hda1 pourrait être contrôlée par la présence de XUT par l'intervention du domaine Arb2 qui peut indirectement interagir avec des ARNdb.

2. Effet du XUT sur la localisation de Hda1

Jusqu'ici nous avons juste regardé l'effet des troncations de Hda1 sur son recrutement et son activité dans un contexte sauvage. Mais que se passe-t-il dans une souche *xrn1Δ* ? Existe-il un recrutement de Hda1 au niveau de *TIR1* ? Pour tester cette hypothèse une ChIP anti-Myc a été réalisée dans des souches tronquées pour Hda1 dans un fond génétique sauvage et *xrn1Δ*.

Les troncations de Hda1 ont le même effet que sa délétion. Hda1 tronquée est toujours présente au niveau de *TIR1*. Etant donné que Hda1 possède un domaine indirectement lié à l'interaction avec des ARNdb, Hda1 pourrait être recrutée au niveau de *TIR1* grâce aux ARNdb qui pourraient s'accumuler dans la souche *xrn1Δ*. Mais une fois stabilisés, ces ARNdb pourraient aussi modifier la fonction de Hda1 sans en modifier la présence le long de *TIR1*. Nous avons donc décidé de trancher entre ces deux hypothèses.

Afin d'observer un éventuel recrutement de Hda1 dans un mutant *xrn1Δ* nous avons tiré parti de la présence de l'étiquette Myc sur Hda1 et sur ses troncations. La chromatine des souches sauvage, *hda1Δ*, *hda1-Myc*, *hda1Δ1-Myc*, *hda1Δ2-Myc*, *hda1Δ3-Myc* et *hda1Δ4-Myc* avec ou sans *XRNI* a été extraite. Ces différentes chromatines ont été utilisées pour faire une

immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps anti-Myc comme décrit précédemment.

Les résultats de cette expérience sont présentés en figure 29C, D et E. Pour la même raison que celle évoquée dans l'expérience de la figure 29B les résultats de cette immunoprécipitation n'ont pas pu être normalisés. Pour la souche Hda1-Myc la quantité d'histone déacétylase liée à la chromatine est faible et constante tout le long de *TIR1* (figure 29C). Le pic observé à 1800nt du codon ATG est dû à du signal aspécifique puisqu'il est aussi visible pour la souche sans étiquette Myc. Pour la troncation *hda1Δ1*, la protéine est présente au niveau de *TIR1*. En revanche elle disparaît dans le mutant *xrn1Δhda1Δ1* puisque l'efficacité d'immunoprécipitation est alors proche de zéro (figure 29D). La perte de *hda1Δ1* quand *XRN1* est délété pourrait expliquer la dérégulation de *TIR1*. Cet effet est aussi visible pour la troncation *hda1Δ4* (figure 29E). En effet dans la souche *xrn1Δhda1Δ4* le niveau de Hda1 tronquée liée à la chromatine est nul alors que Hda1 tronquée est présente dans la souche *hda1Δ4*. Hda1 tronquée est donc moins présente au niveau de *TIR1* dans un mutant *xrn1Δ*. La troncation semble perturber la localisation de Hda1 dans les souches *xrn1Δ*.

Cette expérience permet de tirer deux conclusions. Premièrement les troncations ne perturbent pas la localisation de Hda1 dans les souches contenant *XRN1*. Elles semblent même augmenter son recrutement au niveau du gène *TIR1*. Deuxièmement, au contraire, ces troncations empêchent Hda1 d'être localisée au niveau de la chromatine dans les souches *xrn1Δ* et ce quelle que soit la troncation. Hda1 n'étant plus présent au niveau du gène *TIR1*, celui-ci ne peut plus être réprimé efficacement expliquant ainsi la dérégulation de *TIR1* observée lorsque Hda1 est tronquée.

• Mécanisme d'action de Hda1

I. Hda1 et transcription de *TIR1*

Van Dijk et al ont montré que Xrn1 joue un rôle positif pour l'expression de *TIR1* au niveau de l'ARNm et aussi au niveau de l'ARN polymérase II. Nos résultats montrent que Hda1 est nécessaire à l'extinction de *TIR1* en l'absence de Xrn1. Toutefois son rôle dans la transcription n'est pas encore établi.

Pour déterminer si ces variations sont dues à des effets transcriptionnels ou post-transcriptionnels nous avons étudié l'occupation de l'ARN polymérase II le long du gène *TIR1*. La chromatine a été extraite des souches sauvage, *xrn1Δ*, *hda1Δ*, et *xrn1Δhda1Δ*. Ces

chromatines ont été soniquées et utilisées pour faire une immunoprécipitation de la chromatine en utilisant un anticorps dirigé contre une sous-unité de l'ARN polymérase II. La quantité d'ADN recueillie, reflet du taux d'occupation de l'ARN polymérase II, a été mesurée par PCRq en utilisant des couples d'oligonucléotides localisés le long de *TIR1*. Les mêmes manipulations ont été effectuées avec les souches sauvage, *xrn1Δ*, *hda3Δ*, et *xrn1Δhda3Δ*.

1. Effet de la délétion de Hda1 sur la transcription de *TIR1*

La figure 30C montre que dans la souche sauvage la quantité d'ARN polymérase II est plus élevée au début du gène. Cette quantité décroît jusqu'à la fin du gène vers 1500nt (figure 30C). Au contraire dans la souche *xrn1Δ* la quantité d'ARN polymérase est faible tout le long du gène. En moyenne il y a 2 fois moins d'ARN polymérase II que dans la souche sauvage. Le gène *TIR1* est donc éteint transcriptionnellement dans la souche *xrn1Δ*. Dans la souche *hda1Δ* la quantité d'ARN polymérase II est environ 2 fois plus élevée le long du gène *TIR1* par rapport à la souche sauvage. Le maximum d'ARN polymérase II est atteint au milieu du

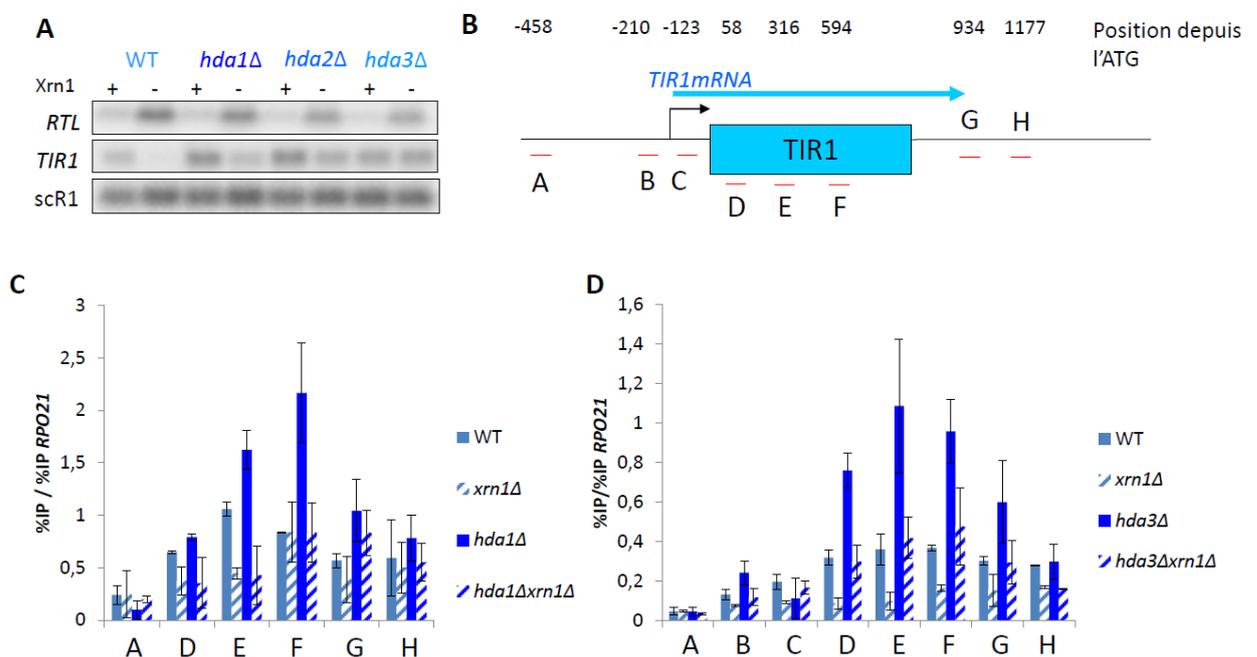


Figure 30 : Effet de la délétion de HDA1 et de HDA3 sur la transcription de *TIR1*

A) Northern blot montrant la dérégulation de *TIR1* dans les mutants *hda1Δxrn1Δ* et *hda3Δxrn1Δ*.

B) Localisation des amorces de PCRq.

C) ChIP anti-ARN polymérase II. La ChIP est réalisée comme précédemment. Les données sont normalisées par rapport au gène *RPO21*.

D) ChIP contre H3K18ac. La ChIP est réalisée comme précédemment. Les données sont normalisées par rapport au gène *RPO21*.

Bleu claire : souches HDA1, bleu foncé : souches *hda1Δ*, hachures : *xrn1Δ*.

gène. Le gène *TIR1* est donc plus transcrit dans la souche *hda1Δ*. Le niveau d'ARN polymérase II dans la souche *hda1Δxrn1Δ* est très proche de celui de la souche *xrn1Δ* sauf à la fin du gène *TIR1*. Ces résultats indiquent que Hda1 n'est pas nécessaire au positionnement de l'ARN polymérase II sur *TIR1*.

2. Effet de la délétion de Hda3 sur la transcription de *TIR1*

Dans cette expérience le niveau d'ARN polymérase II le long du gène *TIR1* dans la souche sauvage est homogène (figure 30D). Dans la souche *xrn1Δ* la quantité d'ARN polymérase II est 2 à 3 fois inférieure à celle observée dans la souche sauvage. Ce résultat confirme l'extinction transcriptionnelle de *TIR1* dans le mutant *xrn1Δ*. Dans la souche *hda3Δ* la quantité d'ARN polymérase II est environ 3 fois supérieure à celle de la souche sauvage. Le gène *TIR1* est donc plus transcrit dans la souche *hda3Δ*. Dans le double mutant *xrn1Δhda3Δ* la quantité d'ARN polymérase II est identique à celle de la souche sauvage. La transcription de *TIR1* est équivalente dans ces deux souches. L'extinction transcriptionnelle de *TIR1* dans la souche *xrn1Δ* est donc supprimée par la délétion *hda3Δ*.

L'étude de l'occupation de l'ARN polymérase II le long du gène *TIR1* permet de tirer deux enseignements. Premièrement l'augmentation de la quantité d'ARN de *TIR1* dans un mutant *hda1Δ* ou *hda3Δ* peut être partiellement expliquée par une augmentation de la transcription du gène. Deuxièmement l'extinction transcriptionnelle de *TIR1* dans la souche *xrn1Δ* est totalement médiée par Hda3. Ceci confirme le rôle du complexe Hda1 dans la transcription de *TIR1*. Cependant il est difficile de concevoir que les effets majeurs observés sur les ARN puissent être expliqués uniquement par les variations de transcription observées ici. La stabilité de l'ARNm de *TIR1* est sans doute mise en jeu. Toutefois il faut noter que nous faisons ici l'équivalence suivante : plus l'ARN polymérase II est présente plus le gène est transcrit. Ceci n'est pas tout à fait exact puisqu'une telle immunoprécipitation ne permet pas de différencier une polymérase en pause d'une polymérase en cours de transcription. Le taux d'occupation de l'ARN polymérase ne rend donc pas directement compte du taux de transcription du gène. De plus, il est impossible de différencier le sens de transcription de l'ARN polymérase.

II. Troncation de Hda1 et transcription de *TIR1*

L'effet de la délétion de *HDA1* dans une souche *xrn1Δ* sur la transcription de *TIR1* est minime. Etant donné que toutes les troncations ont le même effet que la délétion nous avons voulu vérifier si cela était toujours vrai du point de vue de la transcription de *TIR1*.

Pour répondre à cette question nous avons réalisé la même immunoprécipitation de la chromatine avec de la chromatine extraite des souches sauvage, *hda1Δ1-Myc*, *hda1Δ2-Myc*, *hda1Δ3-Myc* et *hda1Δ4-Myc* avec ou sans *XRN1*. La quantité d'ARN polymérase II le long du gène *TIR1* a été mesurée par PCRq.

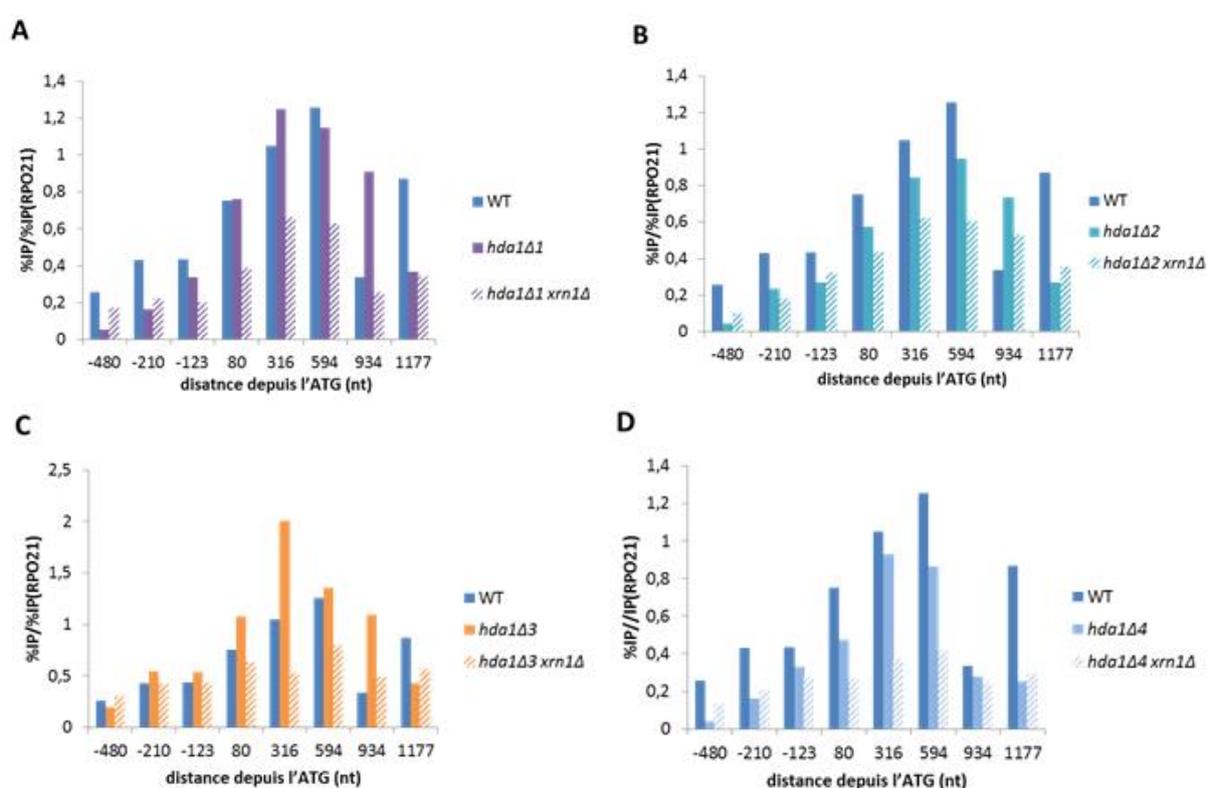


Figure 31 : Troncation de Hda1 et transcription de *TIR1*

La CHIP contre l'ARN polymérase II a été réalisée comme précédemment.

A) Effet de la mutation *hda1Δ1* sur la transcription de *TIR1*

B) Effet de la mutation *hda1Δ2* sur la transcription de *TIR1*

C) Effet de la mutation *hda1Δ3* sur la transcription de *TIR1*

D) Effet de la mutation *hda1Δ4* sur la transcription de *TIR1*

Les barres hachurées correspondent aux mutants *xrn1Δ*.

Dans toutes les souches contenant seulement une troncation de Hda1, la quantité d'ARN polymérase le long du gène *TIR1* est identique à celle de la souche sauvage (figure 31

A à D). Contrairement à la délétion de *HDA1*, les tronctions n'entraînent pas d'augmentation de la quantité d'ARN polymérase *TIR1*. De plus dans toutes les souches *xrn1Δhda1Δ1*, *xrn1Δhda1Δ3*, *xrn1Δhda1Δ3* et *xrn1Δhda1Δ4* la quantité d'ARN polymérase est environ 2 fois plus faible par rapport à la souche sauvage tout comme dans un mutant *xrn1Δ*. La transcription du gène *TIR1* ne varie donc pas entre un mutant Hda1 tronquée et un mutant *xrn1Δhda1* tronquée alors que la quantité d'ARN est différente.

Cette expérience complémentaire permet de tirer deux conclusions importantes. Premièrement, contrairement à la délétion de *HDA1*, les tronctions n'entraînent pas d'augmentation de l'occupation de l'ARN polymérase II au locus de *TIR1*. L'augmentation de la quantité d'ARNm de *TIR1* observée dans ces souches ne peut pas s'expliquer par une augmentation du taux de polymérase sur le gène *TIR1*. Elle est sans doute due à une stabilisation de l'ARNm ou à une meilleure processivité de l'ARN polymérase II. Deuxièmement les tronctions de Hda1 ne causent pas de dérépression transcriptionnelle de *TIR1* lorsque *XRNI* est délété. L'augmentation de l'ARNm observée dans ces souches n'est donc pas due à un effet transcriptionnel mais à un effet co- ou post-transcriptionnel.

Tous ces résultats permettent donc tirer les conclusions suivantes. La délétion de *HDA1* dans un mutant *xrn1Δ* ne provoque pas une augmentation de la transcription de *TIR1*. Les tronctions de *HDA1* qui ont le même effet qu'une délétion au niveau de l'ARN de *TIR1* ont aussi le même effet au niveau de la transcription de ce gène. *HDA1* est sans doute impliqué dans la stabilité de l'ARN de *TIR1*. En revanche *HDA3* est impliqué dans la répression transcriptionnelle dans un mutant *xrn1Δ* puisqu'un le niveau de transcription de *TIR1* dans un mutant *hda3Δxrn1Δ* est similaire à celui d'une souche sauvage. Ceci n'exclut pas un rôle de *HDA3* dans la stabilité de l'ARN de *TIR1*. Il est intéressant de noter que la délétion de deux protéines d'un même complexe n'ont pas le même effet renforçant l'idée d'une fonction différente de chaque sous unité.

III. Hda1 et stabilité de *TIR1*

La quantité d'un ARN dans une cellule est toujours le bilan de sa synthèse et de sa dégradation. Etant donné que la dérépression de *TIR1* n'est pas due à une augmentation de la présence d'ARN polymérase II sur le gène, celle-ci peut être due à une augmentation de la

stabilité de cet ARN. L'influence de Hda1 et Xrn1 sur le temps de demi-vie de *TIR1* a été calculée.

Afin d'étudier l'effet de Hda1 et Xrn1 sur la stabilité de l'ARN de *TIR1* nous avons utilisé un mutant thermosensible pour l'ARN polymérase II. En effet dans le mutant *rpb1-1*, l'ARN polymérase II est fonctionnelle à 25°C mais est inactive à 37°C. Les souches *rpb1-1*, *rpb1-1xrn1Δ* et *rpb1-1xrn1Δhda1Δ* ont été mises en culture à 25°C. Afin d'obtenir une quantité importante d'ARNm de *TIR1* pour pouvoir calculer la demi-vie de cette ARN, ces cultures ont été placées 3h à 10°C. A t=0 ces cultures ont été transférées dans du milieu de culture préalablement chauffé à 37°C. Des aliquots de ces cultures ont été prélevés régulièrement. Les ARN ont ensuite été extraits et quantifiés par RT-PCRq.

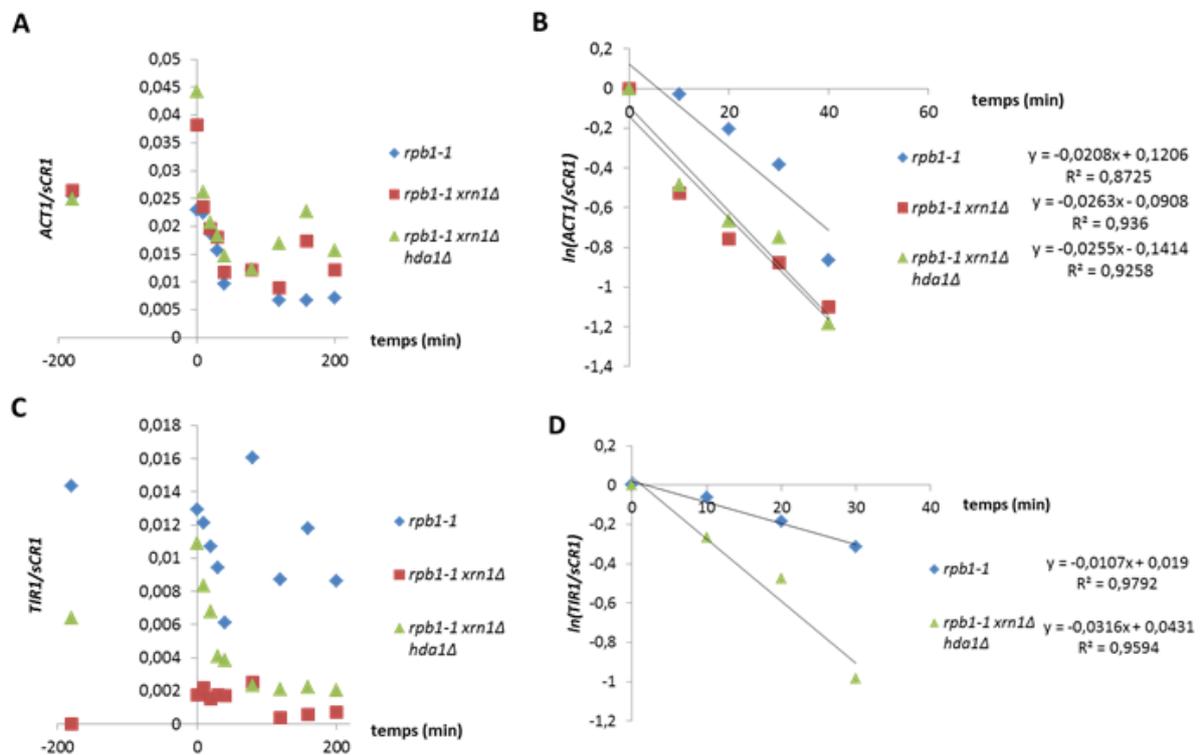


Figure 32 : Hda1 et stabilité de l'ARN de *TIR1*

Les souches portant une mutation thermosensible *rpb1-1* ont été cultivées à 25°C pendant une nuit puis à 10°C pendant 3h. A t=0 les cultures sont basculées à 37°C afin d'inactiver l'ARN polymérase II. Des aliquots sont prélevés régulièrement et les ARN extraits.

RT-PCRq sur A) *ACT1*, C) *TIR1*. Les RT-PCR sont normalisées par *scR1*.

Estimation des temps de demi-vies des ARN B) *ACT1* et D) *TIR1*.

Les équations des droites obtenues par régression linéaire ainsi que les coefficients de corrélation sont indiqués. La demi-vie d'un ARN est égale à $\ln(2)/\text{pente}$.

Afin de normaliser ces résultats nous avons utilisé l'ARN scR1 qui n'est pas transcrit par l'ARN polymérase II. Nous avons aussi regardé l'ARNm de *ACT1* afin de nous assurer de l'efficacité de l'inactivation de l'ARN polymérase II. Les résultats sont présentés en figure 32. Pour toutes les souches la quantité d'ARN d'*ACT1* diminue très rapidement dès le passage à 37°C (figure 32A). A partir de 50 minutes à 37°C l'inactivation de *rpb1* n'est plus très efficace pour la souche *rpb1-lxrn1Δhda1Δ* puisque la quantité d'ARN augmente à partir de ce point. Afin de déterminer précisément le temps de demi-vie de l'ARN de *ACT1*, les différentes valeurs ont été normalisées par rapport au point t=0. Le logarithme de ces valeurs a ensuite été calculé (figure 32B). La pente (k) des droites observées permet de calculer la demi-vie de l'ARN grâce à la relation $t_{1/2} = \ln(2)/(-k)$. Pour la souche *rpb1-1* la demi-vie d'*ACT1* est de 26 minutes ce qui correspond à la demi-vie déjà mesurée par d'autres équipes. Elle est de 38 minutes pour la souche *rpb1-lxrn1Δ*. Etant donné que Xrn1 dégrade des ARNm il est normal que la délétion de *XRN1* entraîne une augmentation de la demi-vie des ARNm. Pour la souche *rpb1-lxrn1Δhda1Δ* elle est de 32 minutes. Il semble donc que *hda1Δ* provoque une légère déstabilisation de l'ARNm de *ACT1*. Pour l'ARNm de *TIR1*, malheureusement la quantité d'ARNm de *TIR1* pour la souche *rpb1-lxrn1Δ* est très faible et invariable : l'induction de *TIR1* à 10°C n'a pas fonctionné pour cette souche (figure 32C). En revanche pour les deux autres souches la quantité d'ARNm de *TIR1* diminue très rapidement après passage à température restrictive. Cette fois c'est la quantité d'ARNm dans la souche *rpb1-1* qui augmente au bout de 50 minutes. L'inactivation de l'ARN polymérase II fonctionne moins bien au bout de ce temps. Mais ceci n'empêche pas de déterminer la demi-vie de *TIR1* dans les mutants *rpb1-1* et *rpb1-lxrn1Δhda1Δ*. La même méthode a été utilisée pour les calculer (figure 32D). Pour la souche *rpb1-1* la demi-vie de l'ARNm de *TIR1* est de 64 minutes ce qui est très long pour un ARNm. Pour la souche *rpb1-1 xrn1Δhda1Δ* la demi-vie est de 22 minutes seulement. Etant donné que la délétion de *XRN1* entraîne une stabilisation des ARNm la délétion de *HDA1* provoque donc une très forte déstabilisation de l'ARNm de *TIR1*. La mesure de l'effet de Hda1 et Xrn1 sur la stabilité de *TIR1* permet d'apporter une conclusion très forte : contrairement à ce qui est attendu la délétion de Hda1 n'entraîne pas une stabilisation de l'ARNm de *TIR1*. Au contraire cette délétion cause une forte déstabilisation de cet ARN. L'augmentation de la quantité d'ARNm de *TIR1* ne s'explique pas par la stabilité de l'ARNm. Il est donc très probable que bien que la présence d'ARN polymérase II soit identique pour les mutants *hda1Δ* et *xrn1Δhda1Δ* elle est sans doute plus efficace pour la transcription dans le mutant *hda1Δ*. L'ARN polymérase II doit être plus lent dans le mutant *xrn1Δhda1Δ* que dans le mutant *hda1Δ*.

Modèles d'action

Tous ces résultats nous ont permis de construire le modèle suivant (figure 33). Dans une souche sauvage, le complexe Hda1 est déjà présent sur la chromatine mais inactif. Le gène *TIR1* est alors exprimé. En absence de Xrn1, *TIR1axut* est stabilisé. Cette stabilisation entraîne l'activation de Hda1. Cette activation pourrait être due à plusieurs phénomènes. Premièrement le XUT pourrait former une boucle R avec le gène *TIR1*. Deuxièmement, le XUT pourrait former un ARNdb avec l'ARNm de *TIR1* puisqu'ils sont antisens dans leur région 3'. Cet ARNdb pourrait servir directement d'activateur de Hda1 ou pourrait être reconnu par une protéine liant les ARNdb. Il existe sept protéines possédant un domaine de reconnaissance d'ARNdb : Mrps5, Rps2, Mrp1, Mrp13, Rad52, Rad59 et Rnt1. Aucune

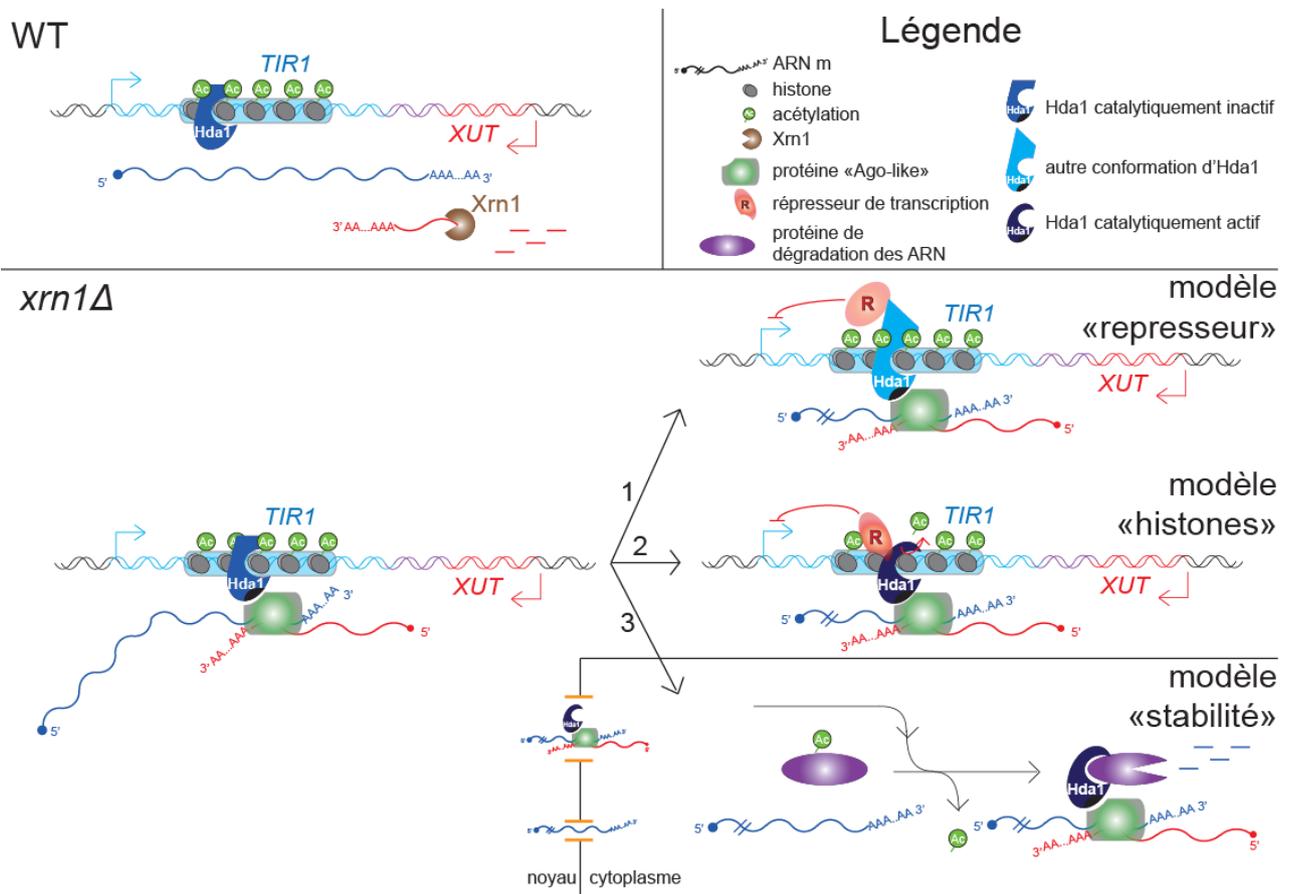


Figure 33 : Modèles d'action de *TIR1axut*

Dans un mutant *xrn1Δ*, la stabilisation de *TIR1axut* entraîne la formation d'ARN double brin reconnu par une protéine Ago-like (comme Rnt1, Rad52, Rad59) ou par Hda1. Cette interaction active Hda1 peut : soit recruter un répresseur qui pourrait être Tup1 ou Ssn6 (modèle « répresseur ») et éteindre le gène *TIR1*, soit déacétyler partiellement le locus ce qui entraîne le recrutement d'un répresseur ou l'augmentation du nombre d'histones localement (modèle « histones »), soit le complexe Hda1 actif déacétyle d'autres protéines comme Dhh1, Pop2, Air2 ou Rnt1, la déacétylation de ces protéines entraînant un changement de la stabilité de l'ARN de *TIR1* (modèle « stabilité »).

interaction entre Hda1c et ces protéines n'a été mise en évidence jusqu'à présent. La protéine/ARNdb pourrait se fixer à Hda1 *via* son domaine Arb2 et ainsi activer Hda1. Une fois activé, le complexe Hda1 pourrait induire la répression de TIR1 par trois mécanismes. La première possibilité est qu'un répresseur se fixe à Hda1c activé et affecte la processivité de l'ARN polymérase II (modèle « répresseur »). Ce modèle ne semble pas favorisé puisqu'aucune variation de taux d'occupation de l'ARN polymérase II n'a pu être détectée dans les différents mutants. La seconde possibilité passe par l'activité d'histone déacétylase de Hda1c. Après activation, le complexe pourrait déacétyler localement les histones et générer ainsi des histones libres d'acétylation. Ceci provoquerait le recrutement d'un répresseur ou l'augmentation locale de la densité de nucléosome qui provoquerait une diminution de la processivité de l'ARN polymérase (modèle histone). Ce modèle présente l'avantage d'expliquer tous nos résultats. Enfin troisièmement, étant donné que Hda1 est une histone déacétylase de classe II, elle peut faire la navette entre le cytoplasme et le noyau. Dans le noyau, Hda1 pourrait déacétyler Air2, qui appartient au complexe TRAMP et modifier la stabilité des ARN. Une fois dans le cytoplasme, Hda1c activé pourrait déacétyler des protéines impliquées dans la stabilité des ARN comme Dhh1 et Pop2⁽³⁵⁵⁾. Rnt1 pourrait aussi être éventuellement déacétylée même si pour le moment la seule HDAC capable de la déacétyler est Rpd3. La déacétylation d'une ou plusieurs de ces protéines entraînerait alors une modification de la quantité d'ARNm de *TIR1* (modèle « stabilité »). Ce modèle est assez spéculatif mais il repose sur la certitude du rôle de Hda1. Cependant, nos données défavoriseraient ce dernier modèle, l'ARNm de *TIR1* n'étant pas stabilisé en absence de Xrn1. De nombreux gènes sont connus pour interagir génétiquement avec Hda1 (tableau 2). De plus, plusieurs protéines interagissant physiquement avec Hda1 sont connues. Nous pourrions tester des candidats parmi ces gènes en sélectionnant les plus pertinents. Malheureusement aucune protéine interagissant physiquement avec Hda1 ne possède de domaine de reconnaissance des ARNdb.

Gène	Type d'interaction	Gène	Type d'interaction	Gène	Type d'interaction	Gène	Type d'interaction
<i>ACS2</i>	IG, +, 5	<i>CDC73</i>	IG, +, 2	<i>GRX5</i>	IG, -, 5	<i>MSH2</i>	IP, 3
<i>ACT1</i>	IG, -, 5	<i>CGR1</i>	IG, -, 4	<i>GZF3</i>	IP, 3	<i>MSK1</i>	IG, -, 4
<i>ADA2</i>	IG, +, 2	<i>CLB5</i>	IG, +, 5	<i>HCM1</i>	IG, +, 2	<i>NHP10</i>	IG, -, 5
<i>ADR1</i>	IG, +, 2	<i>CLC1</i>	IG, -, 5	<i>HDA1</i>	IP, 1	<i>NTO1</i>	IG, +, 1
<i>AIM10</i>	IG, -, 4	<i>CMK1</i>	IP, 5	<i>HDA2</i>	IP, 1	<i>NUT1</i>	IG, -, 4
<i>AIM22</i>	IG, -, 5	<i>CSE2</i>	IG, +, 4	<i>HDA3</i>	IP, 1	<i>OCT1</i>	IP, 5
<i>AIR2</i>	IG, -, 4	<i>CSG2</i>	IG, -, 5	<i>HFI1</i>	IG, +, 2	<i>ORC2</i>	IG, -, 3
<i>AFL1</i>	IG, +, 5	<i>CTI6</i>	IG, +, 2	<i>HHT1</i>	IP, 1	<i>ORC3</i>	IG, -, 3
<i>ALP1</i>	IG, +, 5	<i>CTK1</i>	IG, -, 5	<i>HIS6</i>	IG, +, 5	<i>ORM2</i>	IG, -, 5
<i>ANP1</i>	IG, -, 5	<i>CTK2</i>	IG, -, 5	<i>HOS2</i>	IG, -, 1	<i>OST2</i>	IG, -, 5
<i>APC5</i>	IG, -, 5	<i>CTK3</i>	IG, -, 5	<i>HSC82</i>	IG, -, 5	<i>PAC10</i>	IG, +, 5
<i>APL1</i>	IG, -, 5	<i>CYS4</i>	IG, -, 5	<i>HTA1</i>	IP, 1	<i>PAF1</i>	IG, +, 4
<i>APL2</i>	IG, -, 5	<i>DAL80</i>	IG, 5	<i>HTD2</i>	IG, +, 5	<i>PAP2</i>	IG, +, 4
<i>APL4</i>	IG, -, 5	<i>DPB5</i>	IG, -, 4	<i>HTZ1</i>	IP, 1	<i>PDA1</i>	IG, -, 5
<i>APS1</i>	IG, -, 5	<i>DFG16</i>	IG, -, 5	<i>HXK2</i>	IG, -, 5	<i>PEP5</i>	IG, -, 1
<i>ARC1</i>	IP, 4	<i>DHH1</i>	IG, -, 4	<i>IES1</i>	IG, -, 1	<i>PFD1</i>	IG, +, 5
<i>ARC18</i>	IG, -, 5	<i>DST1</i>	IG, -, 2	<i>IES2</i>	IG, -, 1	<i>PGD1</i>	IG, -, 4
<i>ARD1</i>	IG, +, 1	<i>EAF1</i>	IG, +, 1	<i>IES3</i>	IG, -, 1	<i>PHO13</i>	IG, -, 5
<i>ARK1</i>	IG, -, 1	<i>EAF3</i>	IG, +, 1	<i>IKI3</i>	IG, +, 4	<i>PHO23</i>	IG, -, 1
<i>ARP4</i>	IG, +, 1	<i>EAP1</i>	IG, +, 2	<i>ILM1</i>	IG, -	<i>PHO85</i>	IP, 5
<i>ARP6</i>	IG, -, 1	<i>ELF1</i>	IG, -, 2	<i>INO80</i>	IG, -, 1	<i>POP2</i>	IP, 4
<i>ARP8</i>	IG, +, 1	<i>ELP2</i>	IG, -, 4	<i>IRC20</i>	IG, +, 3	<i>PPA2</i>	IG, -, 5
<i>ASF1</i>	IG, -, 1	<i>ELP3</i>	IG, -, 4	<i>ISA1</i>	IG, +, 5	<i>PPM1</i>	IG, -, 5
<i>ATG1</i>	IG, -, 5	<i>ELP4</i>	IG, -, 4	<i>ISM1</i>	IG, +, 4	<i>PPR1</i>	IG, -, 2
<i>AVO2</i>	IG, -, 5	<i>ELP6</i>	IG, -, 4	<i>IST3</i>	IG, +, 4	<i>PRS3</i>	IG, -, 5
<i>BAS1</i>	IG, +, 1	<i>END3</i>	IG, -, 5	<i>ISW2</i>	IG, -, 1	<i>PYC1</i>	IG, -, 5
<i>BCY1</i>	IG, +, 5	<i>EPL1</i>	IG, +, 1	<i>ITC1</i>	IG, -, 1	<i>RAD30</i>	IG, -, 3
<i>BIM1</i>	IG, +, 5	<i>ERG2</i>	IG, -, 5	<i>IXR1</i>	IG, -, 3	<i>RAD51</i>	IG, -, 3
<i>BNI1</i>	IG, -, 5	<i>ERG25</i>	IG, -, 5	<i>KCS1</i>	IG, -, 5	<i>RAD52</i>	IG, -, 3
<i>BRE1</i>	IG, +, 5	<i>ERG3</i>	IG, -, 5	<i>LEA1</i>	IG, -, 4	<i>RAD54</i>	IG, -, 3
<i>BRR1</i>	IG, +, 4	<i>ESA1</i>	IG, +, 1	<i>LEO1</i>	IG, +, 2	<i>RCO1</i>	IG, -, 1
<i>BUB3</i>	IG, +, 5	<i>EST1</i>	IG, -, 4	<i>LGE1</i>	IG, +	<i>RHB1</i>	IG, -, 5
<i>BUD27</i>	IG, -, 5	<i>GCN5</i>	IG, -, 1	<i>LIP2</i>	IG, -, 5	<i>RIF2</i>	IG, +, 3
<i>CCS1</i>	IG, -, 5	<i>GCS1</i>	IG, -, 5	<i>LSM7</i>	IG, -, 5	<i>RIM101</i>	IG, -, 2
<i>CCW12</i>	IG, -, 5	<i>GET1</i>	IG, -, 5	<i>LTE1</i>	IG, -, 5	<i>RIM13</i>	IG, -, 5
<i>CDC28</i>	IG, -, 5	<i>GIM3</i>	IG, +, 5	<i>MDM39</i>	IG, +, 5	<i>RIM20</i>	IG, -, 2
<i>CDC37</i>	IG, -, 5	<i>GIM4</i>	IG, -, 5	<i>MED1</i>	IG, -, 4	<i>RIM8</i>	IG, -, 2
<i>CDC50</i>	IG, -, 5	<i>GIM5</i>	IG, -, 5	<i>MED7</i>	IG, -, 4	<i>RNR1</i>	IG, +, 3
<i>CDC6</i>	IG, -, 5	<i>GPI8</i>	IG, +, 5	<i>MSC1</i>	IG, -	<i>RPA14</i>	IG, +, 3

Gène	Type d'interaction	Gène	Type d'interaction	Gène	Type d'interaction
<i>RPB4</i>	IG, +, 3	<i>SKY1</i>	IG, +, 5	<i>TRA1</i>	IG, -, 1
<i>RPD3</i>	IG, +, 1	<i>SLX5</i>	IG, +, 5	<i>TRM7</i>	IG, -, 5
<i>RPF1</i>	IG, -, 5	<i>SLX8</i>	IG, -, 5	<i>TSC11</i>	IG, -, 5
<i>RPL24A</i>	IG, -, 5	<i>SMT3</i>	IP, 5	<i>TSR2</i>	IG, -, 4
<i>RPN10</i>	IG, -, 5	<i>SNF1</i>	IG, +, 5	<i>TUB3</i>	IG, +, 5
<i>RPN4</i>	IG, -, 2	<i>SNF4</i>	IG, +, 1	<i>TUP1</i>	IP, 2
<i>RPP2B</i>	IG, -, 5	<i>SNF8</i>	IG, -, 4	<i>UBC4</i>	IG, +, 5
<i>RPS4B</i>	IG, -, 5	<i>SNT1</i>	IG, +, 1	<i>UBP14</i>	IG, -, 5
<i>RPT2</i>	IG, -, 5	<i>SOD1</i>	IG, -, 5	<i>UBP3</i>	IG, -, 5
<i>RPT4</i>	IG, -, 5	<i>SPT10</i>	IG, +, 1	<i>UBP6</i>	IG, -, 5
<i>RRD1</i>	IP, 4	<i>SPT20</i>	IG, +, 2	<i>UBP8</i>	IG, -, 5
<i>RRP15</i>	IG, -, 5	<i>SPT4</i>	IG, -, 4	<i>ULP1</i>	IG, -, 5
<i>RSC1</i>	IG, +, 1	<i>SPT7</i>	IG, -, 2	<i>UME1</i>	IG, -, 5
<i>RSC2</i>	IG, -, 1	<i>SPT8</i>	IG, -, 2	<i>UME6</i>	IG, +, 5
<i>RSC4</i>	IG, +, 1	<i>SQS1</i>	IG, -, 4	<i>URE2</i>	IG, +, 5
<i>RTF1</i>	IG, +, 1	<i>SRB2</i>	IG, +, 4	<i>USO1</i>	IG, +, 5
<i>RTG3</i>	IG, -, 2	<i>SRB8</i>	IG, +, 4	<i>VPS17</i>	IG, -, 5
<i>RUP1</i>	IP, 5	<i>SRO9</i>	IG, +, 4	<i>VPS20</i>	IG, -, 4
<i>RVS161</i>	IG, -, 5	<i>SSB1</i>	IP, 4	<i>VPS25</i>	IG, -, 4
<i>RXT2</i>	IG, +, 1	<i>SSK2</i>	IG, -, 5	<i>VPS27</i>	IG, -, 5
<i>SAC3</i>	IG, +, 5	<i>SSL1</i>	IG, -, 2	<i>VPS33</i>	IG, -, 5
<i>SAC6</i>	IG, -, 5	<i>SSN3</i>	IG, -, 5	<i>VPS34</i>	IG, -, 5
<i>SAP155</i>	IG, -, 5	<i>SSN6</i>	IP, 2	<i>VPS36</i>	IG, -, 4
<i>SAP30</i>	IG, -, 1	<i>STP22</i>	IG, -, 4	<i>VPS4</i>	IG, -, 5
<i>SBA1</i>	IP, 5	<i>SUM1</i>	IG, -, 4	<i>VPS52</i>	IG, -, 5
<i>SCS7</i>	IG, +, 5	<i>SUR1</i>	IG, -, 5	<i>VPS71</i>	IG, -, 1
<i>SDS3</i>	IG, +, 1	<i>SWC3</i>	IG, -	<i>VPS72</i>	IG, -, 1
<i>SEC22</i>	IG, -, 5	<i>SWC4</i>	IG, +, 1	<i>VPS8</i>	IG, +, 5
<i>SET2</i>	IG, -, 1	<i>SWC5</i>	IG, +, 1	<i>XRN1</i>	IG, -, 4
<i>SET3</i>	IG, +, 1	<i>SWI3</i>	IG, +, 1	<i>YAF9</i>	IG, +, 1
<i>SGF11</i>	IG, -, 2	<i>SWI6</i>	IG, -, 2	<i>YKE2</i>	IG, +, 5
<i>SHE4</i>	IG, -, 5	<i>SWR1</i>	IG, -, 1	<i>YNG1</i>	IG, +, 1
<i>SHP1</i>	IG, -, 5	<i>TAF6</i>	IG, +, 2	<i>YNG2</i>	IG, +, 1
<i>SHU1</i>	IP, 4	<i>TCP1</i>	IG, -, 5	<i>YPT6</i>	IG, -, 5
<i>SIC1</i>	IG, -, 5	<i>TDA5</i>	IG, -		
<i>SIN3</i>	IP, 1	<i>TEX1</i>	IG, -, 4		
<i>SIN4</i>	IG, -, 4	<i>TIF6</i>	IP, 5		
<i>SIR2</i>	IG, -, 1	<i>TOP1</i>	IG, +, 3		
<i>SIR3</i>	IG, +, 1	<i>TOS3</i>	IP, 5		

Tableau 2 : Gènes interagissant avec Hda1

Liste des gènes ayant une interaction génétique (IG, en vert) ou une interaction physique (IP, en rose) avec Hda1. Source : SGD. Les interactions synergiques sont en vert foncé (notées +), les interactions antagonistes sont en vert claires (notées -). Les chiffres de 1 à 5 correspondent au rôle de la protéine interagissant avec Hda1. 1 : modification de la chromatine, 2 : facteur de transcription, 3 : interaction avec l'ADN, 4 : interaction avec l'ARN, 5 : métabolisme général

Cependant une question reste en suspens. Comment ces ARNnc entraînent-ils une répression ciblée sur le gène dont ils sont antisens ? Si le XUT lui-même est impliqué dans la répression du gène cible comme c'est le cas pour le Ty1 alors deux hypothèses peuvent être formulées. La première fait intervenir des hybrides ARN/ADN. En effet le XUT pourrait interagir avec l'ADN. Cette interaction peut être facilitée par la transcription du gène cible. La structure ainsi formée est appelée boucle R. Cette structure en double hélice prend une conformation intermédiaire entre une hélice Z et une hélice B. Elle est donc différente de la structure d'une double hélice d'ARN. Cette structure pourrait être reconnue par des protéines et induire une répression transcriptionnelle du gène concerné. Etant donné que les XUT sont majoritairement antisens de gènes ils peuvent interagir avec les ARN messagers de ces mêmes gènes et former des ARN double-brin (ARNdb). Puisque *Saccharomyces cerevisiae* ne possède pas de protéines impliquées dans les voies d'ARN interférence ces ARNdb ne sont pas dégradés en petits ARN. Ces ARNdb peuvent donc être suffisamment stables pour avoir un rôle dans l'expression des gènes ciblés. En effet un XUT pourrait interagir avec l'ARNm néo-naissant et former un ARNdb qui pourrait être reconnu par des facteurs protéiques qui induiraient la répression transcriptionnelle du gène ainsi ciblé. Afin de tester le premier modèle nous avons essayé de mettre en évidence l'existence de boucles R au niveau de gènes régulés par des XUT en utilisant un anticorps reconnaissant la structure d'un hybride ARN/ADN.

. Caractérisation d'hybrides ARN/ADN par l'anticorps S9.6

La détection d'hybride ARN/ADN a permis de mesurer l'expression des ARN directement sur une puce ADN sans passer par une étape de transcription inverse. Les ARN extraits ont directement été hybridés sur puce. La présence des ARN a simplement été révélée en incubant la puce avec l'anticorps S9.6. Cette technique a permis de mettre en évidence plusieurs familles d'ARNnc (³⁵⁶). Nous nous sommes procurés la lignée cellulaire qui synthétise cet anticorps. Une production d'anticorps S9.6 a été réalisée à partir de cultures d'hybridomes de souris excréant cet anticorps. Après purification par chromatographie d'affinité cet anticorps a été testé afin de déterminer sa spécificité en utilisant divers substrats composés d'acides nucléiques ainsi que sa sensibilité afin de déterminer quelle quantité minimale d'hybrides cet anticorps peut détecter.

I. Caractérisation de l'anticorps S9.6 *in vitro*

Afin de déterminer la spécificité de cet anticorps, un dot blot a été réalisé. Différents substrats composés d'acides nucléiques ont été fixés sur une membrane. L'ARN double brin (ARNdb) a été obtenu en hybridant deux oligonucléotides complémentaires. Les ARN sens et antisens ont été obtenus par transcription *in vitro*. Un plasmide contenant le promoteur de la polymérase SP6 suivi d'une séquence à transcrire dans une orientation sens ou antisens a été construit. La transcription réalisée grâce à la polymérase SP6 permet donc d'obtenir deux ARN qui sont complémentaires l'un de l'autre. Le produit de cette transcription *in vitro* a été ensuite digéré par une DNase. L'ARNdb a été obtenu en hybridant les ARN complémentaires obtenus précédemment. L'hybride ARN/ADN a été obtenu en hybridant un ARN avec un oligonucléotide complémentaire. Ces différentes molécules ont été digérées par une RNase A attaquant les ARNs, une RNase H attaquant l'ARN d'un hybride ARN/ADN. Le produit de ces digestions a été déposé sur une membrane puis incubé avec l'anticorps S9.6. Après plusieurs lavages cette membrane est incubée avec un anticorps de souris couplé à la peroxydase du raifort.

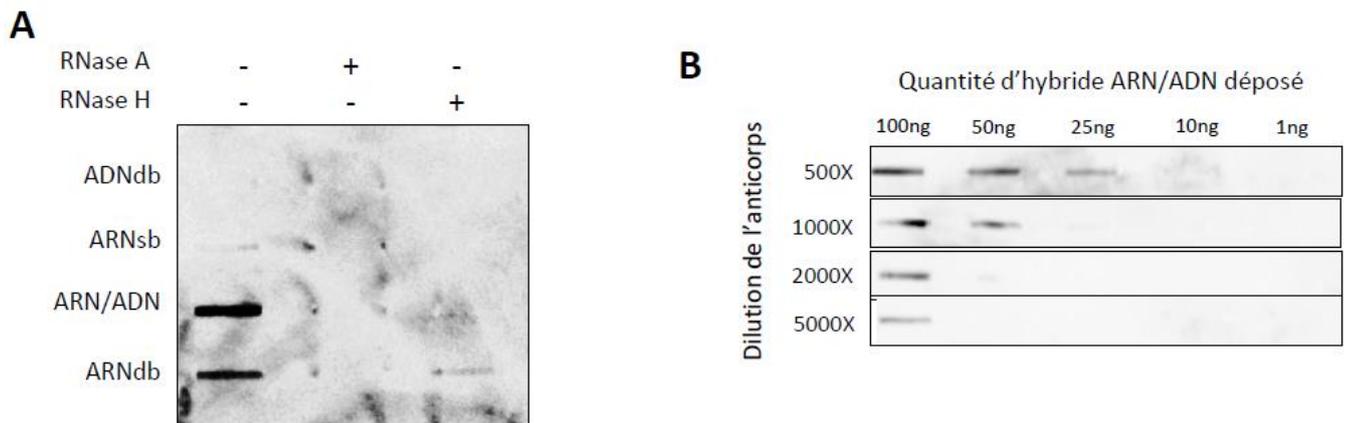


Figure 34 : Spécificité et sensibilité de l'anticorps S9.6

A) Dot blot permettant de visualiser la spécificité de reconnaissance des hybrides ARN/ADN par l'anticorps S9.6. 100ng d'acides nucléiques de chaque espèce sont déposés sur une membrane qui est ensuite mise en contact avec l'anticorps S9.6. Après lavage la présence de l'anticorps est révélée par un anticorps dirigé contre l'anticorps S9.6.

B) Dot blot permettant de visualiser la sensibilité de l'anticorps vis-à-vis des hybrides ARN/ADN. Différentes quantités d'hybrides ARN/ADN sont déposées sur différentes membranes. Chaque membrane est incubée avec une concentration décroissante en anticorps S9.6. Après lavage la présence de l'anticorps est révélée par un anticorps dirigé contre l'anticorps S9.6.

1. Spécificité de l'anticorps S9.6

Les résultats concernant la spécificité sont présentés en figure 34A. 100ng de chaque complexe nucléotidique digéré ou non ont été déposés sur la membrane. Sans digestion un signal est bien visible pour l'hybride ARN/ADN et pour l'ARNdb. Lorsque ces acides nucléiques sont digérés par la RNase A, ces deux signaux disparaissent. Lorsque ces acides nucléiques sont digérés par la RNase H seule, le signal situé au niveau de l'hybride ARN/ADN disparaît complètement. Un signal résiduel reste présent au niveau de l'ARNdb. L'anticorps S9.6 reconnaît bien les hybrides ARN/ADN puisqu'un signal est visible pour l'hybride ARN/ADN, bande qui disparaît après digestion de cet hybride par la RNase H. Il faut noter aussi que la digestion de l'hybride ARN/ADN par la RNase A fait aussi disparaître le signal alors que la RNase A est une exonucléase qui ne peut pas digérer un ARN hybridé à un autre acide nucléique. Il est probable que ceci soit dû à l'utilisation d'une quantité trop grande de RNase A. Cet anticorps reconnaît aussi les ARNdb puisqu'un signal est visible pour l'ARNdb, bande qui ne disparaît pas complètement après digestion par la RNase A. Ce résultat n'est pas surprenant puisqu'une équipe a montré que cet anticorps pouvait être utilisé

pour détecter des ARNdb dans le plasma sanguin (³⁵⁷). Etant donné que la digestion de l'ARNdb par la RNase H n'entraîne pas la disparition totale du signal il est certain que le signal visible est dû à des ARNdb. Il semble que l'anticorps reconnaisse mieux les hybrides ARN/ADN que les ARNdb car le signal observé est plus important dans le premier cas. De plus sur les 100ng d'ARN utilisé pour faire de l'ARNdb 100% est sous forme d'ARNdb. En revanche pour les hybrides ARN/ADN l'ARN synthétisé est plus long que l'ADN donc sur 100ng de matériel une fraction significative n'est pas sous forme d'hybride ARN/ADN.

2. Sensibilité de l'anticorps S9.6

Afin de tester la sensibilité de l'anticorps S9.6 plusieurs quantités d'hybrides ARN/ADN et plusieurs dilutions d'anticorps ont été utilisées (figure 34B). Les quantités d'hybrides varient de 1ng à 100ng. Les facteurs de dilutions testés vont de 500 à 5000. La présence de l'anticorps est révélée comme précédemment. Pour la dilution de l'anticorps la plus élevée (5000 fois) une seule bande est observée pour 100ng. Aucune autre bande n'est observée. La présence de l'anticorps n'est détectable qu'avec 100ng d'hybrides. Pour un facteur de dilution de 2000 le résultat est identique. Lorsque l'anticorps est dilué 1000 fois une bande est observée pour 100 et 50ng d'hybride. Avec cette dilution la présence de l'anticorps est détectable jusqu'à 50ng. Enfin quand l'anticorps est dilué 500 fois trois signaux sont observés : pour 100, 50 et 25ng. Dans ces conditions la présence de l'anticorps est détectée pour des conditions allant jusqu'à 25ng.

Ces deux expériences permettent de tirer trois conclusions. Premièrement l'anticorps S9.6 reconnaît bien les hybrides ARN/ADN mais aussi les ARNdb dans une moindre mesure. De plus la reconnaissance des hybrides ARN/ADN par l'anticorps S9.6 est abolie par une digestion à la RNase H ce qui constitue un très bon témoin négatif. Deuxièmement, en utilisant une dilution assez faible de l'anticorps, des quantités faibles d'hybrides peuvent être reconnues indiquant que cet anticorps pourrait être utilisé pour réaliser une immuno-précipitation de chromatine.

II. Recherche d'hybride ARN/ADN *in vivo*

Un des modèles permettant d'expliquer le mode d'action d'un XUT fait intervenir des hybrides ARN/ADN entre le XUT et l'ADN du gène cible. Afin de tester cette hypothèse il est important de pouvoir mettre en évidence ces hybrides sur des gènes comme *TIR1* et le rétrotransposon Ty1. Si la présence d'hybride est confirmée, une étude à l'échelle du génome pourrait être réalisée.

Afin de mettre en évidence l'existence d'hybrides ARN/ADN une immunoprécipitation de chromatine utilisant l'anticorps S9.6 a été réalisée. Afin de se mettre dans les meilleures conditions pour identifier ces hybrides une souche stabilisant ces hybrides a été utilisée. Il s'agit de la souche *hpr1Δ*. *HPRI* est une sous-unité du complexe THO/TREX impliqué dans l'export des ARN ³⁵⁸. Le groupe d'Andrés Aguilera a montré que dans un mutant *hpr1Δ* le ralentissement de l'export des ARN de grands gènes riche en GC entraînait l'accumulation d'hybride ARN/ADN au niveau de ces gènes (³⁵⁹⁻³⁶²). La souche *hpr1Δxrn1Δ* a été mise en culture jusqu'à ce que la DO₆₀₀ atteigne 0,5. Les cultures ont été ensuite cross-linkées ou non en utilisant du formaldéhyde. La chromatine a été extraite et dosée par mesure de l'absorbance à 260nm, puis digérée ou non par la RNase H pour tester la spécificité du signal. L'anticorps S9.6 a été fixé sur des billes magnétiques. 1,5μg de chromatine sont ensuite mis en contact avec l'anticorps fixé sur les billes. Après plusieurs lavages la chromatine captée par les anticorps a été éluée, digérée par la pronase pour éliminer les protéines et par la RNase A pour éliminer les ARN. L'ADN ainsi récupéré a été quantifié par PCR quantitative, en utilisant des amorces situées dans la région du rétrotransposon *TY1*. Un contrôle utilisant des billes sans anticorps a aussi été réalisé.

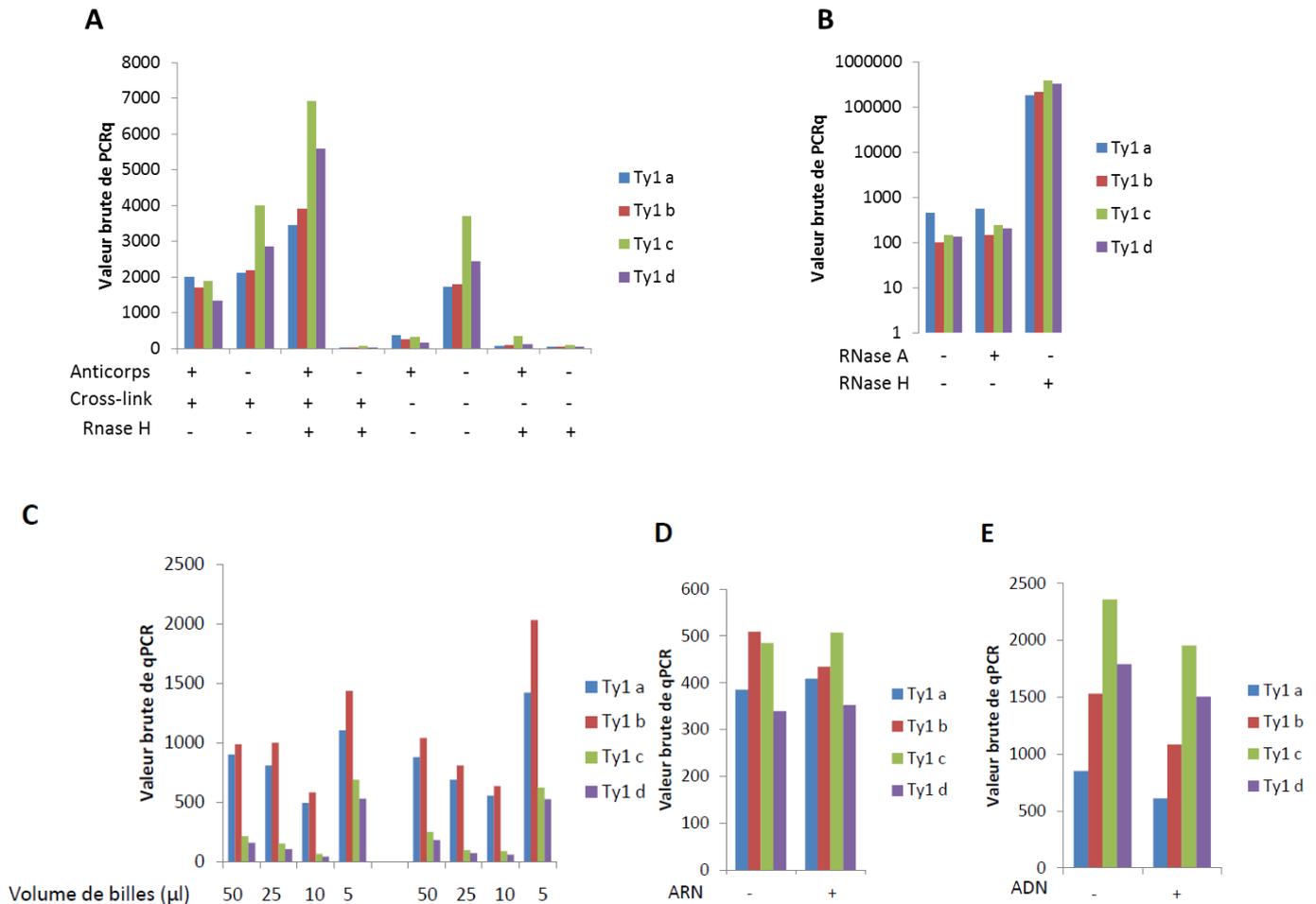


Figure 35 : Immunoprécipitation de la chromatine avec l'anticorps S9.6

Les amorces de PCRq utilisées correspondent au locus de *TY1*.

A) ChIP de comparaison de l'efficacité d'immunoprécipitation entre de la chromatine crosslinkée et non crosslinkée, données non normalisées.

B) Mesure de la spécificité du signal obtenu après IP par digestion à la RNase A et la Rnase H par qPCR, données non normalisées.

C) Tentative de réduction du bruit de fond en utilisant différentes quantités de billes. Des PCRq ont été effectuées après IP utilisant une quantité décroissante de billes mais une quantité identique d'anticorps.

D) et E) Tentative de réduction du bruit de fond par saturation des billes avec des acides nucléiques (ARN en D, ADN en E). Des PCRq ont été réalisées après IP utilisant des billes saturées par de l'ADN ou de l'ARN.

Les résultats obtenus à la suite des qPCR sont présentés dans la figure 35A. De l'ADN est amplifié par qPCR pour l'immunoprécipitation avec l'anticorps S9.6 avec de la chromatine non cross-linkée, quel que soit le couple de qPCR utilisé. En revanche lorsque la chromatine non cross-linkée est utilisée le signal est 5 fois plus faible. Il est même quasi-nul. Cependant, lorsque la même immunoprécipitation est faite sans anticorps les valeurs obtenues

après la qPCR sont identiques lorsque la chromatine est cross-linkée. Elles sont même 5 fois supérieures pour de la chromatine non cross-linkée. Ceci montre que l'ADN récupéré à l'issue de l'immunoprécipitation n'est pas spécifique de l'anticorps mais sans doute dû à une interaction non spécifique avec les billes. Cette interaction non spécifique est encore plus forte avec de la chromatine non cross-linkée. En outre après traitement à la RNase H la quantité d'ADN obtenue après IP est au moins aussi forte que la quantité d'ADN obtenue après IP sans traitement. Ceci est vrai que la chromatine soit cross-linkée ou non. Cette observation semble confirmer l'hypothèse que l'ADN récupéré lors de l'IP est dû à des interactions non spécifiques. Curieusement le signal aspécifique obtenu sans anticorps est réduit à 0 après traitement à la RNase H que la chromatine soit cross-linkée ou non. Ceci indique que l'ADN purifié non spécifique ou accroché aux billes est associé à des ARN stimulant ainsi son association non spécifique.

Cette expérience amène trois conclusions essentielles. La première est que le cross-link de la chromatine semble augmenter l'efficacité d'immuno-précipitation. La deuxième conclusion est que le signal aspécifique obtenu lors de l'immuno-précipitation est beaucoup trop important et doit impérativement être réduit. Troisièmement il semble que le traitement à la RNase H ne permet pas d'identifier le signal réellement dû aux éventuels hybrides ARN/ADN. Ces différents paramètres doivent donc être optimisés.

III. Optimisation des paramètres d'immuno-précipitation

1. Impact de la quantité de billes magnétiques sur le signal aspécifique

L'objectif est de réduire le signal aspécifique c'est-à-dire la fixation de chromatine sur les billes sans intervention de l'anticorps. Pour cela une stratégie consiste à diminuer la quantité de billes utilisées afin de réduire les sites d'interactions aspécifiques. Bien évidemment il faut aussi vérifier que la quantité d'anticorps encore présent est saturante et permette de récupérer toujours la même quantité de matériel. Diverses quantités de billes ont été testées allant de 5 à 50 μ l. La souche de levure, la quantité de chromatine ainsi que les couples de qPCR utilisés sont les mêmes.

Les résultats obtenus lors de cette expérience sont présentés en figure 35C. En absence d'anticorps, le signal obtenu lors de la qPCR diminue avec la quantité de billes entre 50 et 10 μ l de billes quel que soit le couple de qPCR considéré. Etrangement le signal obtenu avec

5µl de billes est très élevé. Cependant bien que la quantité de billes soit divisée par 5 entre ces deux points le signal obtenu ne diminue que de 75%. Le signal aspécifique n'est donc pas proportionnel à la quantité de billes. En terme de ratio (signal aspécifique)/(quantité de billes), la meilleure condition est donc celle avec 50µl d'anticorps. En présence d'anticorps les résultats obtenus sont très proches de ceux sans anticorps. En effet même si la valeur de l'ADN amplifié par qPCR ne semble pas diminuer entre 25 et 50µl de billes, elle diminue pour 10µl de billes. Ceci pourrait indiquer qu'avec 25µl de billes l'anticorps est toujours en quantité saturante par rapport aux hybrides ARN/ADN si l'immunoprécipitation fonctionnait. Cependant les quantités d'ADN amplifiées par qPCR avec ou sans anticorps sont trop proches pour pouvoir conclure sur l'efficacité de l'IP.

Cette expérience amène 3 conclusions. Premièrement bien que le signal aspécifique diminue avec la quantité de billes utilisée le ratio (signal aspécifique)/(quantité de billes) augmente avec la diminution de la quantité de billes. Ceci signifie que, proportionnellement le bruit de fond augmente avec la diminution du volume de billes utilisée. Deuxièmement il semble que l'efficacité de l'immuno-précipitation avec l'anticorps n'augmente plus à partir de 25µl de billes. Dans ces conditions l'anticorps semble saturant pas rapport à la quantité d'hybrides ARN/ADN. Et enfin le signal aspécifique reste toujours dramatiquement trop proche du signal obtenu avec l'anticorps pour pouvoir tirer une conclusion sur la réussite de l'immuno-précipitation. Une autre solution permettant de réduire le bruit de fond doit être trouvée.

2. Impact de la saturation des billes magnétiques par des acides nucléiques sur le signal aspécifique

Comme signalé précédemment le signal aspécifique semble provenir de l'interaction de la chromatine avec les billes. Afin de limiter cet effet, les billes sont préalablement incubées avec des acides nucléiques pour saturer tous les sites de liaisons aspécifiques des ARN/ADN sur les billes.

a. Saturation par des ARN

Afin de tester la possibilité d'une interaction directe entre des ARN et les billes, celles-ci ont préalablement été saturées avec des ARN. Afin de ne pas entraîner d'interaction entre les ARN saturants et la chromatine, nous avons utilisé des ARN totaux humains, extraits de

culture de cellules Hela. Des billes ont donc été incubées (ou non) avec des ARN. Ces billes ont ensuite été mises en contact avec de la chromatine. Le matériel récupéré est préparé comme précédemment. Ce matériel est ensuite quantifié en utilisant les mêmes couples de PCRq. Les résultats obtenus sont présentés en figure 35D. Quel que soit le couple de PCRq considéré, les niveaux d'ADN quantifiés après interaction avec les billes sont les mêmes que les billes aient été saturées avec des ARN humains ou non. La saturation des billes par de l'ARN ne permet pas de réduire le signal aspécifique. Les interactions mises en jeu ne sont donc pas des interactions ARN/billes. Le signal aspécifique peut donc être dû à des interactions ADN/billes.

b. Saturation par des ADN

Afin de tester cette dernière hypothèse des billes ont été saturées par de l'ADN de thymus de veau. Des billes ont donc été incubées ou non avec de l'ADN. Ces billes ont ensuite été mises en contact avec de la chromatine. Le matériel récupéré est préparé comme précédemment. Ce matériel est ensuite quantifié en utilisant les mêmes couples de PCRq. Les résultats obtenus sont présentés en figure 35E. Quel que soit le couple de PCRq considéré, le signal obtenu après saturation des billes avec de l'ADN est environ 10% inférieur au signal obtenu sans saturation. Il semble donc que la saturation des billes par de l'ADN permette de réduire partiellement le signal aspécifique. Une partie des interactions aspécifiques correspond donc à des interactions ADN/billes. Cependant la réduction du signal aspécifique n'est pas encore suffisante. Le signal aspécifique ne peut malheureusement pas être réduit par des méthodes conventionnelles. Nous aurions pu tester une saturation des billes par des hybrides ARN/ADN synthétisés au laboratoire. Dans ce dernier cas, l'anticorps aurait préalablement été incubé avec la chromatine afin d'éviter une titration de celui-ci par les hybrides artificiels.

3. Impact du traitement à la RNase H sur l'efficacité de qPCR

Parallèlement à ces tests, l'impact du traitement à la RNase H sur l'efficacité de PCRq a été étudié. En effet il n'est pas possible d'exclure un effet direct de cette enzyme sur l'efficacité de PCRq. Afin de tester cette hypothèse, la chromatine a été extraite et traitée de manière similaire à celle récupérée après immunoprécipitation. Cette chromatine a ensuite été traitée ou non par de la RNase A ou de la RNase H. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 35B. Quel que soit le couple de PCRq considéré le niveau d'ADN amplifié est le même avec ou sans traitement à la RNase A. Cependant, de manière surprenante un traitement

à la RNase H augmente d'un facteur 1000 la quantité d'ADN mesurée ! La quantité de chromatine utilisée au départ étant la même nous pouvons donc en conclure que le traitement à la RNase H augmente considérablement l'efficacité de PCRq à partir de chromatine. Ceci peut s'expliquer par la présence d'hybride ARN/ADN. En effet, sans traitement à la RNase H de tels hybrides sont susceptibles de se former. Ces hybrides étant plus stables que de l'ADNdb l'ADN pris dans un hybride ARN/ADN est donc piégé et ne peut pas être amplifié. Ces hybrides masqueraient une partie de l'ADN présent. La destruction de ces hybrides permettrait alors de libérer cet ADN piégé, augmentant artificiellement la quantité d'ADN présent. Enfin ces hybrides ne sont dégradés que suite à l'action de la RNase H. Un traitement à la RNase A ne permet pas de les éliminer puisque les résultats obtenus sont identiques avec ou sans traitement à la RNase A.

Bien que la caractérisation de l'anticorps S9.6 montre qu'il reconnaît bien les hybrides ARN/ADN *in vitro* son utilisation *in vivo* n'a pas pu être réalisée. Cependant la littérature montre qu'une telle entreprise était possible. En effet, l'équipe de Nicholas Proudfoot a utilisé avec succès le même anticorps afin de montrer que l'hélicase Sen1 était impliquée dans la dissociation des hybrides ARN/ADN (³⁶³). Toutefois une analyse précise de leurs données ne permet pas de conclure aussi clairement.

Troisième Chapitre : Conclusion et perspectives

. *Stratégies expérimentales*

De nombreux exemples de gènes régulés par des ARNnc et faisant intervenir des modifications des histones sont connus. Ces régulations impliquent presque systématiquement des histones méthyl-transférases et parfois des histones déacétylases. Nous avons montré ici un nouvel exemple de gène régulé par un ARNnc et une histone déacétylase. En effet, Hda1 est nécessaire pour le maintien du silence de *TIR1* en présence de *TIR1axut*. La délétion de *HDA1* provoque une absence de silence de *TIR1* même en présence de *TIR1axut*. Ceci n'est pas directement dû à l'accumulation de H3K14ac et H3K18ac puisque des mutations mimant une acétylation constitutive ne reproduisent pas les mêmes résultats. De plus l'impossibilité d'acétyler H3K14 et H3K18 est aussi associée à une absence de silence. *TIR1* serait donc éteint grâce à la présence d'histones contenant des résidus positivement chargés. Etant donné que la stabilité de l'ARN de *TIR1* n'est pas augmentée dans un mutant *hda1Δ*, il est naturel de penser que le silence de *TIR1* est dû à une diminution de la processivité de l'ARN polymérase II. Ce phénomène n'est pas forcément facile à observer, même en ChIP puisque la présence de l'ARN polymérase ne nous renseigne pas directement sur sa capacité à transcrire un ARN. Afin de tester la possibilité d'une terminaison légèrement de la transcription de *TIR1* en présence de son XUT il serait intéressant de localiser précisément l'ARN polymérase le long du gène. En effet avec une technique de ChIP classique la résolution n'est que de 300 nucléotides (tailles des fragments obtenus après sonication et utilisés lors des ChIP). Afin d'améliorer cette résolution nous pourrions utiliser la technique de ChIP-exo récemment mise au point par Rhee et Pugh (³⁶⁴). Cette technique repose sur une digestion de l'ADN immunoprécipité par une exonucléase qui digère l'ADN de 5' vers 3'. La digestion est bloquée par les protéines cross-linkées à l'ADN. Le raccourcissement des fragments d'ADN augmente grandement la résolution de la ChIP. Dans notre cas le positionnement de l'ARN polymérase serait ainsi mieux connu.

Afin d'identifier les effets de Hda1 sur l'efficacité de transcription nous pourrions tirer parti d'une technique récemment mise au point. Le NET-seq (Native Elongating Transcript sequencing) permet de séquencer des ARN en cours de synthèse (¹³³). Elle repose sur

l'immuno-précipitation de l'ARN polymérase II et le séquençage haut-débit des ARN ayant co-immuno-précipités. Elle permet de connaître le niveau de transcription d'un ARN en cours de synthèse au nucléotide près. Cette technique a été utilisée pour mettre en évidence le rôle de Rpd3 dans l'orientation de la transcription à partir d'un promoteur (¹³³). Cette technique permet aussi de visualiser des pauses de l'ARN polymérase. Churchman et Weissmann ont mis au point un algorithme permettant de détecter ces sites et ont ainsi pu mettre en évidence que des pauses de l'ARN polymérase arrivaient fréquemment après les 700 premières paires de bases (¹³³). Nous pourrions utiliser cette technologie à notre avantage en réalisant un NET-seq dans une souche sauvage et *hda1Δxrn1Δ* pour comparer les sites de pauses de l'ARN polymérase le long du gène *TIR1*. Nous pourrions ainsi savoir si l'ARN polymérase a un défaut de processivité pour la transcription du gène *TIR1* comme le suggèrent nos résultats.

En outre, bien que l'importance de Hda1 ne soit plus mise en doute dans ce mécanisme, le ciblage de Hda1 vis-à-vis du gène n'est pas encore clair. Comme nous l'avons vu il existe un lien fort entre méthylation des histones et recrutement et/ou activation d'HDAC. Il serait donc intéressant de rechercher le lien entre Set1 et Hda1 en observant l'effet de la délétion simultanée de ces deux protéines sur l'expression de *TIR1*. De plus, étant donné que la méthylation de H3K4 pourrait être le facteur activateur, l'étude de mutants ponctuels d'histones supprimant cette marque pourrait être intéressante. Nous pourrions tester la mutation ponctuelle H3K4A, mais aussi la mutation H3R2A qui est sensée abolir H3Kme2/3 (²⁷⁴) simulant ainsi l'absence de H3K4me2/3 sans supprimer le gène *SET1*.

De plus, la question du ciblage par ARNdb ou hybride ARN/ADN reste posée. Afin de tenter d'apporter une réponse nous pourrions tout d'abord étudier l'effet de l'introduction de Dicer et Argonaute de *S. castellii* chez *S. cerevisiae* (¹¹⁵). Si le ciblage est dû à des ARNdb il est probable que les gènes dépendants de XUT ne soient alors plus mis sous silence dans un mutant *xrn1Δ*. De plus afin d'identifier des ARNdb *in vivo*, nous pourrions tirer parti du fait que l'anticorps S9.6 reconnaisse aussi les ARNdb. Nous pourrions ainsi tenter une immunoprécipitation de l'ARN et y chercher la présence de XUT. Concernant la possibilité d'un rôle des hybrides ARN/ADN, il serait judicieux de sur-exprimer les RNase H1 et RNase H2 de *S. cerevisiae* afin d'en étudier l'impact. La déstabilisation des hybrides ARN/ADN devrait entraîner une absence de silence de *TIR1* même dans une souche *xrn1Δ*.

Par ailleurs, afin de s'assurer que le rôle de Hda1 que nous avons identifié n'est pas limité à un seul gène, il faudrait tester d'autres gènes régulés par des XUT. Afin d'augmenter

les candidats potentiels nous pourrions tirer parti d'une observation sur l'effet de la délétion de *HST1*. En effet Hst1 semble être, tout comme Xrn1 un facteur positif de l'expression des gènes ayant un XUT (figure 22). La double délétion *hst1Δxrn1Δ* éteint ainsi de manière presque totale le gène *TIR1*. Il serait donc utile de tester cet effet sur d'autres gènes régulés par des XUT afin de confirmer ce résultat puis de faire un séquençage haut-débit des ARN de cette souche afin d'identifier plus facilement tous les gènes sensibles à ce mécanisme. Après avoir identifié ces nouveaux candidats, nous pourrions tester l'effet de Hda1 sur ces gènes. En cas d'identification de plusieurs autres gènes régulés de la sorte, un séquençage haut-débit des ARN d'une souche *hda1Δxrn1Δ* pourrait être envisagé afin d'identifier de manière globale tous les gènes régulés par un XUT faisant intervenir Hda1.

D'autre part, afin de mieux appréhender le rôle de Hda1 dans cette régulation il serait intéressant de pouvoir construire un mutant conditionnel de Hda1. Nous avons vu qu'une mutation thermosensible n'est pas idéale pour l'étude de *TIR1*. Nous pourrions utiliser le système auxine-Degron développé récemment (³⁶⁵). Ce système repose sur la synthèse d'un système de dégradation des protéines contenant une étiquette Degron. Celle-ci est induite par l'hormone végétale auxine. Cette méthode est bien adaptée à la levure puisqu'il a été montré que l'auxine n'a aucun effet sur le transcriptome de la levure. Grâce à cette technique nous pourrions contrôler le moment précis d'inactivation de Hda1 et ainsi savoir si Hda1 intervient dans l'initiation et/ou le maintien du silence de *TIR1*.

Du reste, dans notre modèle il reste à identifier une protéine capable d'interagir avec l'ADN double-brin. Il serait intéressant de tester l'effet de Rnt1 (RNase III double-brin spécifique) sur la régulation de *TIR1*. Cette méthode serait complémentaire à l'étude de l'effet du Dicer et Argonaute sur l'importance des ARN double-brin. De plus, bien qu'une interaction directe n'ait pas encore été mise en évidence entre Hda1 et Rnt1, nous pourrions tester cette hypothèse grâce à une co-immuno-précipitation. Dans l'hypothèse où Hda1 interagirait directement avec des ARNdb nous pourrions tirer parti de l'étiquette Myc rajoutée à Hda1. En effet, nous pourrions réaliser une immunoprécipitation d'ARN avec un anti-corps dirigé contre Myc. Nous pourrions aussi tester l'effet de la troncation de Hda1 sur d'éventuelles interactions avec des ARN. En cas d'identifications d'ARN associés à Hda1, un séquençage haut-débit des ARN immunoprécipités pourrait être réalisé afin d'identifier tous les ARNnc interagissant avec Hda1.

. *Perspectives Générales*

Nous avons donc montré ici le lien entre un ARNnc et des modifications épigénétiques, en l'occurrence l'acétylation de H3K14 et H3K18 par Hda1. Il ne s'agit pas du seul exemple de lien entre HDAC et ARNnc chez *S. cerevisiae*. En effet nous avons vu que Hda1 était impliquée dans la régulation de *PHO84* et Rpd3 dans la régulation de *SUC2*, du locus *GALI-10*. Ce lien existe aussi chez *S. pombe*. En effet nous avons vu que des HDAC intervenaient pour la mise en place de l'hétérochromatine centromérique où Sir2 serait nécessaire à la méthylation de H3K9 (³⁶⁶). Des HDAC seraient aussi impliquées dans la régulation du transposon *Tf2* (³⁶⁷). De plus nous avons vu que de nombreux cancers étaient liés à des dysfonctionnements des HDAC, cancers qui sont aussi souvent reliés à des ARNnc. Il est donc tentant de conclure que les grands ARNnc sont intimement liés à la régulation de gènes par des HDAC. Mais nous avons vu que les grands ARNnc font aussi intervenir d'autres modifications des histones et notamment la méthylation. En effet bien que le lien entre ARNnc et HDAC ne soit pas directement établi, une histone méthyl-transférase est impliquée. De manière générale, les interactions directes entre ARNnc et histone-méthyl-transférases sont mieux connues (tableau 1). Les ARNnc peuvent servir de plateformes de recrutement ou d'activation de ces complexes afin de contrôler l'expression d'un ou plusieurs gènes.

Les petits ARNnc sont aussi liés à des modifications épigénétiques. En effet nous avons vu que l'hétérochromatine centromérique était mise en place grâce à des siARN. Nous avons aussi vu que les piARN induisent la méthylation de l'ADN au niveau des régions contenant des éléments transposables constituant ainsi une protection contre la transposition de ces éléments. Nous pourrions donc associer petits ARNnc à la méthylation des histones et de l'ADN et les grands ARNnc à l'acétylation et la méthylation des histones. Il est envisageable que les histones-méthyl-transférases déposent une marque qui est reconnue par les effecteurs terminaux qui seraient dans ce cas les HDAC ou les DNMT. La compréhension de ces mécanismes est cruciale. En effet, de nombreuses dérégulations d'ARNnc ont pu être reliées à des cancers. Il est important de connaître le lien entre ARNnc et modificateurs d'histones afin de multiplier les potentielles cibles de nouveaux traitements. Il serait possible ainsi d'avoir plusieurs cibles thérapeutiques afin d'augmenter les chances de succès du traitement.

Quatrième Chapitre : Matériel et méthodes

Construction de souche :

Les délétions des différents gènes sont effectuées de l'ATG jusqu'au codon stop. Elles sont réalisées à partir de produits de PCR contenant un marqueur de sélection (KanMX6 ou *HIS3*) flanqué de séquences de 60 nucléotides complémentaires des régions 5' et 3' du gène à déléter. Les amorces utilisées pour synthétiser les produits de PCR sont présentées en tableau 3.

Transformation de levure :

Des levures chimio-compétentes sont obtenues en utilisant le kit Frozen EZ Transformation II (Zymo Research). Dans le cas de l'utilisation du marqueur *HIS* les cellules transformées avec 10µg d'ADN sont étalées sur boîte CSM-HIS. Dans le cas de l'utilisation du marqueur KanMX4 les cellules transformées sont d'abord étalées sur YPD puis répliquées sur YPD + Kanamycine. Les clones obtenus sont vérifiés par PCR en utilisant des amorces situées en amont et en aval des sites de recombinaison. Dans le cas de la construction des troncations de Hda1, les clones obtenus ont été séquencés afin d'éliminer toutes présences de mutations. L'ensemble des souches utilisées est présenté en tableau 4.

Préparation de l'anticorps S9.6 :

Culture des hybridomes de souris :

Les hybridomes de souris sont cultivées en flasque de 250ml dans du milieu IMDM (Gibco®) complémenté avec du sérum de cheval 3%, hypoxanthine 0,1mM, thymidine 0,016mM à 37°C. Le milieu de culture est renouvelé tous les 3 jours. Il est récupéré après centrifugation à 3000rpm pendant 3min, quand les cellules ont atteint 2,5 millions de cellules par ml.

Purification de l'anticorps :

L'anticorps est purifié par chromatographie d'affinité sur une colonne constituée de billes retenant les anticorps de souris. 0,1g de billes sont resuspendus dans 20ml d'eau et incubés 30min sur roue tournante à température ambiante. Les billes lavées avec du Tris 100mM pH 8. 4ml de Tris 1M pH 8 sont ajoutées à 40ml de milieu de culture récupérés

précédemment et passés 3 fois sur la colonne à raison de 2ml par minute. La colonne est ensuite lavée avec 20ml de Tris 100mM pH 8 puis avec 20ml de Tris 10mM pH 8. L'anticorps est élué par le passage de 500µl de glycine (2,5M). L'éluat est récupéré dans 500µl de Tris 1M pH 8. La quantité d'anticorps a été mesurée par dosage au BCA. La pureté de l'anticorps a été vérifiée en gel d'acrylamide.

Transcription *in vitro* :

Des produits de PCR contenant le promoteur de l'ARN polymérase SP6 ainsi que la séquence à transcrire sont utilisés. La transcription est réalisée dans un volume final de 20µl contenant 0,2mM de chaque ribonucléotide, 0,1mM DTT, 10 unités de polymérase SP6 (Fermentas), pendant 2h à 37°C. Elle est suivie d'une digestion par la DNase I (1U) pendant 30min à 37°C. Les enzymes sont inactivées après passage à 65°C pendant 10min. Les ARN obtenus sont purifiés après précipitation avec 100µl d'éthanol absolu et resuspendus dans 20µl d'eau sans RNase.

Dot Blot :

Les ARNdb/ADNdb sont préparés en hybridant une masse égale de deux ARN/ADN antisens. Les hybrides ARN/ADN sont préparés à partir d'une masse égale d'ARN et d'ADN antisens. Les hybridations sont faites dans du tampon d'hybridation (Tris pH 8, EDTA 10mM, NaCl 500mM) pendant 4 min à 94°C. Les tubes sont ensuite refroidis lentement jusqu'à 40°C. Les acides nucléiques sont transférés par aspiration sur une membrane Hybond N+ (GE Healthcare), préalablement lavée dans du tampon SSC 20X. Le crosslink des acides nucléiques est fait sous une lampe à UV (1200 J).

Détection des acides nucléiques par l'anticorps S9.6.

La membrane est incubée avec 20ml de tampon PBS, Tween 0,05%, BSA 3% pendant 1h à température ambiante sous agitation, puis l'anticorps est ajouté (volume dépendant de la dilution utilisée) et la membrane incubée pendant 1h à température ambiante sous agitation. La membrane est ensuite lavée 3 fois pendant 5min avec du tampon PBS, Tween 0,05%, BSA 3%. La membrane est ensuite incubée 30min à température ambiante sous agitation avec un anticorps anti-souris couplé à la peroxydase du raifort. Puis la membrane est lavée 3 fois pendant 5min avec du PBS, Tween 0,05%, BSA 3%.

Western Blot

25µg de protéines sont déposés dans chaque piste. La migration est réalisée en gel pré-coulé NU-PAGE 4-12% (Life technologies) pendant 2h à 100V en tampon de migration (Life Technologies). Les protéines sont transférées sur une membrane PVDF, préalablement lavée à l'éthanol, par transfert semi-sec en appliquant une tension de 20V pendant une heure en chambre froide. La membrane est saturée une nuit avec 50ml de PBS, Tween 0,1%, lait 2%, puis incubée pendant une heure avec l'anticorps choisi dilué 5000 fois dans 20ml de PBS, Tween 0,1%, lait 2%. La membrane est ensuite lavée 2 fois 15 minutes avec du 30 ml de PBS, Tween 0,1% (PBST). Puis la membrane est incubée avec 20ml de PBST contenant l'anticorps anti-souris couplé à la peroxydase du raifort pendant 45min. Enfin la membrane est lavée 2 fois 15 minutes avec du 30 ml de PBS, Tween 0,1% (PBST).

Révélation

Ce protocole aussi utilisé pour le Dot blot et le Western Blot. Elle est faite en utilisant le kit SuperSignal West Pico Detection (Thermo Scientific). 2ml de chaque réactif sont mélangés et étaler sur la membrane, pendant 5 minutes. La détection de la chimioluminescence se fait grâce à une caméra LAS3000®.

Culture de levures :

Les cultures sont par défaut effectuées à 30°C en YPD. En cas d'utilisation d'autres conditions, celles-ci sont précisées dans le texte. Les cultures sont toutes stoppées à $DO_{600}=0,5$. Les cellules sont récupérées après une centrifugation à 3000rpm pendant 2 minutes, et congeler dans de l'azote liquide.

Extraction d'ARN :

Le culot cellulaire est lavé avec de l'eau sans RNase. Les cellules sont ensuite congelées dans de l'azote liquide. 300µl de phénol acide pH=4,7 (Sigma) et 300µl de tampon TES (Tris 10mM pH 7,4, 5mM EDTA, 1% SDS) sont ajoutés. Les tubes sont incubés à 65°C pendant 20min sous une agitation de 1400rpm. Les tubes sont congelés dans l'azote liquide et centrifugés 20min à 13000rpm à température ambiante. La phase aqueuse est transférer dans un nouveau tube contenant 250µl de phénol-chlorophorme pH=5 (Sigma). Les tubes sont centrifugés pendant 10min à 13000rpm. La phase aqueuse est transférée dans un tube contenant 800µl d'éthanol 100%. Les tubes sont congelés pendant une nuit puis centrifugés

pendant 30min à 13000rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé, le culot séché et resuspendu dans 100µl d'eau sans RNase. La concentration massique en ARN est ajustée à 1µg.ml⁻¹.

Transcription inverse (RT) :

La transcription inverse est réalisée en utilisant le Kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies). 1µg d'ARN est ajouté à 4µl de tampon First Strand®, 2µl d'amorce spécifique à 5mM, 2µl de DTT 0,1M dans un volume final de 20µl. Les tubes sont incubés 10min à 65°C puis plongés dans la glace. 2µl sont mis de côté pour vérifier l'absence d'ADN en PCRq. 0,2µl de DTT 0,1M, 0,4µl de tampon First Strand®, 0,4µl d'eau et 1µl de SuperScript II Reverse Transcriptase sont ajoutés. Les tubes sont incubés 40min à 42°C puis 10min à 80°C. Enfin 180µl d'eau sont ajoutés. Les quantités d'ADN des différents échantillons sont ensuite déterminées par PCRq.

Northern blot :

Migration :

10µg d'ARN sont migrés sur gel d'agarose 1,5% préparé à partir de tampon FA (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid (MOPS) 20mM, acétate de sodium 5mM, EDTA 1mM) contenant 1% de formaldéhyde pendant 3h à 50V. Le gel est lavé avec de l'eau puis incubé 20min avec NaOH 50mM, 2 fois 15min avec du tampon de neutralisation (NaCl 2,5M, Tris pH7 1,5M) et 15min dans du tampon SSC 1X (Euromedex). Les ARN sont transférés sur une membrane Hybond N⁺ (GE Healthcare).

Marquage radioactif :

1µl d'amorce à 10mM est ajouté à 4µl de tampon PNK (Poly Nucléotide Kinase, Invitrogen), 2µl d'ATP radioactif, 1µl de PNK et 13µl d'eau, incubé à 37°C pendant 1 heure, et filtré sur colonne (Biorad). Les amorces marquées sont ajoutées sur les membranes préalablement incubées 15min avec 5ml de tampon d'hybridation (Ambion) à 42°C. L'hybridation dure une nuit. Les membranes sont ensuite lavées avec du SSC 2X, 0,1%SDS puis 2 fois avec du SSC 0,5X, SDS 0,1%. La présence de radioactivité est révélée grâce à l'utilisation d'un phospho-imageur.

Immuno-précipitation de Chromatine :

Préparation de la chromatine :

A $DO_{600}=0,5$, 3ml de formaldéhyde 36% sont ajoutés au 100ml de milieu de culture et incubés à température ambiante pendant 15min. Puis 20ml de glycine sont ajoutés suivi d'une incubation de 5min, d'une centrifugation de 3min à 3000rpm à 4°C, d'un lavage avec du Tris pH7,5 20mM. Le culot est resuspendu dans 500 μ l de tampon FA-150 (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 50mM Hepes, 1mM EDTA, 150mM NaCl). 200 μ l de micro-billes de verre sont ajoutés. Les tubes sont agités 4 fois 1min à 3000rpm dans un MagnaLyser®. La chromatine est récupérée après 1min de centrifugation à 1000rpm à 4°C. Les billes sont lavées avec 700 μ l de tampon FA-150. La chromatine est centrifugée 20min à 13000rpm à 4°C puis resuspendue dans 1ml de tampon FA-150. Elle est soniquée en utilisant un sonicateur Misonix avec des cycles de 10 secondes à une amplitude de 20 pendant 4min. La chromatine soniquée est récupérée après centrifugation à 5000rpm pendant 20min à 4°C. La taille des fragments obtenus est vérifiée sur un gel d'agarose 1,5% après digestion et décrosslink à 65°C pendant une nuit avec 6 μ l de pronase (20mg.ml⁻¹, Roche). La quantité d'ADN est estimée en mesurant la quantité de protéines grâce à un dosage au BCA.

Immuno-précipitation :

200 μ g de protéines sont utilisés par immuno-précipitation. Les billes Pan Mouse IgG® (Invitrogen) sont lavées 2 fois avec du PBS 1X, BSA 0,1%, puis incubées avec l'anticorps pendant 1h à 21°C. 25 μ l de billes et 2,5 μ l d'anticorps sont utilisés par IP. Les billes sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS 1X, BSA 0,1% et reprises dans du PBS 1X, BSA 1%. 200 μ g de chromatine sont ajoutés à 50 μ l de billes dans 500 μ l de tampon FA-150 et incubés 3h à 21°C sous une agitation de 1300rpm. Les billes sont ensuite lavées 3 fois avec du tampon FA-150, une fois avec du tampon FA-500 (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 50mM Hepes, 1mM EDTA, 500mM NaCl), une fois avec du tampon TE et une fois avec du tampon LiCl (0,25mM LiCl, 1% NP-40, 1% dioxycholate, 1mM EDTA, 10mM Tris HCl pH8). La chromatine immuno-précipitée est éluée dans 100 μ l de tampon pronase (50mM Tris pH8, 25mM EDTA, 1,25% SDS) à 65°C pendant 45min sous une agitation de 600rpm. La chromatine éluée est décrosslinkée à 65°C pendant une nuit en présence de pronase (20mg.ml⁻¹, Roche), digérée par 1 μ l de RNase A (1mg.ml⁻¹ Sigma) pendant 1h à 37°C et purifiée sur colonne (PCR Purification Kit, Qiagen).

PCR quantitative

Les PCR quantitatives sont réalisées dans avec 3µl de Syber-Green master mix®, 0,5µl de chaque amorce à 10mM et 3µl d'ADN. La PCR est réalisée en plaque 396 puits dans un Light Cycler 480®. La PCR se déroule ainsi :

Dénaturation : 5min, 95°C

40 cycles d'amplification : 15sec 95°C

15sec 55°C

20sec 72°C

Courbe de fusion : 30sec 95°C

30sec 65°C

95°C, 10 acquisitions par degré

Refroidissement : 30sec, 40°C

La courbe de fusion permet de vérifier la présence d'un unique produit de PCR.

Tableau 3 : Listes des souches utilisées dans cette étude

liste des souches	type	génotype	origine
sauvage	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0	euroscarf
<i>xrn1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>xrn1::KanMX4</i>	euroscarf
<i>set3Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>set3::KanMX</i>	euroscarf
<i>rpd3Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>rpd3::KanMX</i>	euroscarf
<i>hda1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hda1::KanMX</i>	euroscarf
<i>hda2Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hda2::KanMX</i>	euroscarf
<i>hda3Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hda3::KanMX</i>	euroscarf
<i>hst1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hst1::KanMX</i>	euroscarf
<i>hst2Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hst2::KanMX</i>	euroscarf
<i>hst3Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hst3::KanMX</i>	euroscarf
<i>set3Δxrn1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>set3::KanMX</i> <i>xrn1::HIS3</i>	cette étude
<i>rpd3Δxrn1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>rpd3::KanMX</i> <i>xrn1::HIS</i>	cette étude
<i>hda1Δxrn1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 <i>hda1::KanMX</i> <i>xrn1::HIS</i>	cette étude
<i>hda2Δxrn1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hda2::KanMX</i> <i>xrn1::HIS3</i>	cette étude
<i>hda3Δxrn1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hda3::KanMX</i> <i>xrn1::HIS3</i>	cette étude
<i>hst1Δxrn1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hst1::KanMX</i> <i>xrn1::HIS3</i>	cette étude
<i>hst2Δxrn1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hst2::KanMX</i> <i>xrn1::HIS3</i>	cette étude
<i>hst3Δxrn1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hst3::KanMX</i> <i>xrn1::HIS3</i>	cette étude
<i>hda1-myc</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HDA1- MYC::HIS3	cette étude
<i>hda1Δ410-706Myc</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hda1Δ410-706-</i> MYC::HIS3	cette étude
<i>hda1Δ600-706Myc</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hda1Δ600-706-</i> MYC::HIS3	cette étude
<i>hda1Δ650-706Myc</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hda1Δ650-706-</i> MYC::HIS3	cette étude
<i>hda1Δ680-706Myc</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hda1Δ680-706-</i> MYC::HIS3	cette étude
<i>hda1-myc xrn1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 HDA1- MYC::HIS3 <i>xrn1::KanMX4</i>	cette étude
<i>hda1Δ410-706Myc</i> <i>xrn1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hda1Δ410-706-</i> MYC::HIS3 <i>xrn1::KanMX4</i>	cette étude
<i>hda1Δ600-706Myc</i> <i>xrn1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hda1Δ600-706-</i> MYC::HIS3 <i>xrn1::KanMX4</i>	cette étude
<i>hda1Δ650-706Myc</i> <i>xrn1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hda1Δ650-706-</i> MYC::HIS3 <i>xrn1::KanMX4</i>	cette étude
<i>hda1Δ680-706Myc</i> <i>xrn1Δ</i>	BY 4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 <i>hda1Δ680-706-</i> MYC::HIS3 <i>xrn1::KanMX4</i>	cette étude

liste des souches	type	génotype	origine
sauvage	S288C	MATa his3D200 leu2D0 lys2D0 trp1D63 ura3D0 met15D0 hht1-hhf1::NatMx4 can1::MFA1pr-HIS3 [pjP11]	J. Boeke
<i>xrn1Δ</i>	S288C	MATa his3D200 leu2D0 lys2D0 trp1D63 ura3D0 met15D0 hht1-hhf1::NatMx4 can1::MFA1pr-HIS3 [pjP11] <i>xrn1::hph</i>	cette étude
<i>hda1Δ</i>	S288C	MATa his3D200 leu2D0 lys2D0 trp1D63 ura3D0 met15D0 hht1-hhf1::NatMx4 can1::MFA1pr-HIS3 [pjP11] <i>hda1::kanMX6</i>	cette étude
<i>hda1Δxrn1Δ</i>	S288C	MATa his3D200 leu2D0 lys2D0 trp1D63 ura3D0 met15D0 hht1-hhf1::NatMx4 can1::MFA1pr-HIS3 [pjP11] <i>hda1::kanMX6 xrn1::HPH</i>	cette étude
H3K14A	S288C	MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3 hht1-hhf1::NatMX4 hht2-hhf2::[HHT lys14::ala-hhf2]-URA3	J. Boeke
H3K14R	S288C	MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3 hht1-hhf1::NatMX4 hht2-hhf2::[HHT lys14::arg-hhf2]-URA3	J. Boeke
H3K14Q	S288C	MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3 hht1-hhf1::NatMX4 hht2-hhf2::[HHT lys14::glu-hhf2]-URA3	J. Boeke
H3K18A	S288C	MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3 hht1-hhf1::NatMX4 hht2-hhf2::[HHT lys18::ala-hhf2]-URA3	J. Boeke
H3K18R	S288C	MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3 hht1-hhf1::NatMX4 hht2-hhf2::[HHT lys18::arg-hhf2]-URA3	cette étude
H3K14A <i>xrn1Δ</i>	S288C	MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3 hht1-hhf1::NatMX4 hht2-hhf2::[HHT lys14::ala-hhf2]-URA3 <i>xrn1::HPH</i>	cette étude
H3K14R <i>xrn1Δ</i>	S288C	MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3 hht1-hhf1::NatMX4 hht2-hhf2::[HHT lys14::arg-hhf2]-URA3 <i>xrn1::HPH</i>	cette étude
H3K14Q <i>xrn1Δ</i>	S288C	MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3 hht1-hhf1::NatMX4 hht2-hhf2::[HHT lys14::glu-hhf2]-URA3 <i>xrn1::HPH</i>	cette étude
H3K18A <i>xrn1Δ</i>	S288C	MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3 hht1-hhf1::NatMX4 hht2-hhf2::[HHT lys18::ala-hhf2]-URA3 <i>xrn1::HPH</i>	cette étude
H3K18R <i>xrn1Δ</i>	S288C	MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3 hht1-hhf1::NatMX4 hht2-hhf2::[HHT lys18::arg-hhf2]-URA3 <i>xrn1::HPH</i>	cette étude

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées dans cette étude

Gène	Séquence	utilisation	orientation
<i>TIR1 A</i>	GCTTCGAAGCAGAATAGGGA	RT et PCRq	sens
<i>TIR1 A</i>	GGATCTAGCCAGGCACGGA	PCRq	antisens
<i>TIR1 B</i>	TTCGTTTTGAACTGCGTTTG	RT et PCRq	sens
<i>TIR1 B</i>	CAACAAGATTCAACCGACCTT	PCRq	antisens
<i>TIR1 C</i>	AAGGTCGTTGAATCTTGTTG	RT et PCRq	sens
<i>TIR1 C</i>	TTGTTGAAAGCGAATGAAAAA	PCRq	antisens
<i>TIR1 D</i>	CTGCTATTGCTGCTTTGGCT	RT et PCRq	sens
<i>TIR1 D</i>	AGCTAATGTA CTCTTGCAAGTGAGA	PCRq	antisens
<i>TIR1 E</i>	TGAAGTCTTTGAATGGTGATGCT	RT et PCRq	sens
<i>TIR1 E</i>	GAAGAAGTTGGGGCAGCAGA	RT, PCRq, Northern Blot	antisens
<i>TIR1 F</i>	TCTCTCAAATTACCGATGGTCA	RT et PCRq	sens
<i>TIR1 F</i>	GTTGTGGTCGTGGGTATGGT	PCRq	antisens
<i>TIR1 G</i>	TGCTGATTGAAACATCATGTCA	RT et PCRq	sens
<i>TIR1 G</i>	TGCCACCCATTTCTTTAAC	PCRq	antisens
<i>TIR1axut</i>	CTATAGTTTTTCTGTGCCAT	RT, PCRq, Northern Blot	sens
<i>TIR1axut</i>	GTCTTCACACTGCACAAAA	PCRq	antisens
<i>sCR1</i>	GGCTGTAATGGCTTTCTGG	PCRq	sens
<i>sCR1</i>	GTGCGGAATAGAGAACTATCC	RT, PCRq, Northern Blot	antisens
<i>RPO21</i>	ATGGTAGGACAACAGTATTC	PCRq	sens
<i>RPO21</i>	GTTTCATCCATTGTCTCTGG	RT, PCRq, Northern Blot	antisens
<i>CYC7</i>	GCAAAGACAAAGGCACACAA	PCRq	sens
<i>CYC7</i>	TTGATTTTGTTTCAACCTCAACA	PCRq	antisens
<i>ADNr</i>	AATCGACCGATCCTGATGTC	PCRq	sens
<i>ADNr</i>	TACGAGCCTCCACCAGAGTT	PCRq	antisens
<i>XRN1</i>	ACTTGTAACAACAGCAGCAACAAATATATATCAGTAC GGTCGGATCCCCGGGTTAATTAA	délétion de <i>XRN1</i>	sens
<i>XRN1</i>	TAAAGTAACCTCGAATATACTTCGTTTTTAGTCGTATG TTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	délétion de <i>XRN1</i>	antisens
<i>HDA1</i>	AGGGAAAGTTGAGCACTGTAATACGCCGAACAGATT AAGCCGGATCCCCGGGTTAATTAA	délétion de <i>HDA1</i>	sens
<i>HDA1</i>	GAAGGTTGCCGAAAAAAAAATTATTAATGCCAGTTTT TCCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	délétion de <i>HDA1</i>	antisens
<i>HDA1</i>	CTTTATACTGGATTTCGTTTGAAGAATGGAGTGATGAA GAACGGATCCCCGGGTTAATTAA	étiquette Myc	sens
<i>HDA1</i>	GCTTAATGCATTTGTTCACTTTCTTTTCTATTTTAGAT AGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	étiquette Myc	antisens
<i>HDA1</i>	GCCTCTGATGAACTACCTGATCCATTAAGTGATCCCA AGCGGATCCCCGGGTTAATTAA	troncation Δ 410-706 Myc	sens
<i>HDA1</i>	TGCCAAAATTGCTTTTATTGGAATAGGAGACTCATACT CACGGATCCCCGGGTTAATTAA	troncation Δ 600-706 Myc	sens
<i>HDA1</i>	AACATTGAGTGAATGGTACTTCAAAACTCACTTATAT TTCGGATCCCCGGGTTAATTAA	troncation Δ 650-706 Myc	sens
<i>HDA1</i>	AAAAAAATTCGGTAGAGTTTTGAGATGTGATACGGAC GGGCGGATCCCCGGGTTAATTAA	troncation Δ 680-706 Myc	sens
<i>TyB</i>	CCGATAAAAACATTTAACTATTAACAAACAAATGG	Northern	antisens
<i>RTL</i>	GAGGAGAACTTCTAGTATATTCTGTATACC	Northern	sens

Bibliographie

1. Taft, R. J. *et al.* Nuclear-localized tiny RNAs are associated with transcription initiation and splice sites in metazoans. *Nature structural & molecular biology* **17**, 1030–1034 (2010).
2. Kapranov, P. *et al.* RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* **316**, 1484–1488 (2007).
3. Mattick, J. S. & Makunin, I. V. Small regulatory RNAs in mammals. *Human molecular genetics* **14**, R121–R132 (2005).
4. David, L. *et al.* A high-resolution map of transcription in the yeast genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 5320–5325 (2006).
5. Harrow, J. *et al.* GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* **22**, 1760–1774 (2012).
6. Derrien, T. *et al.* The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* **22**, 1775–1789 (2012).
7. Bánfai, B. *et al.* Long noncoding RNAs are rarely translated in two human cell lines. *Genome Res.* **22**, 1646–1657 (2012).
8. Birney, E. *et al.* Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**, 799–816 (2007).
9. Van Bakel, H., Nislow, C., Blencowe, B. J. & Hughes, T. R. Most ‘Dark Matter’ Transcripts Are Associated With Known Genes. *PLoS Biology* **8**, e1000371 (2010).
10. Robinson, R. Dark Matter Transcripts: Sound and Fury, Signifying Nothing? *PLoS Biology* **8**, e1000370 (2010).
11. Genomics: Not-so-dark genome. *Nature* **465**, 401–401 (2010).
12. Robertson, M. The evolution of gene regulation, the RNA universe, and the vexed questions of artefact and noise. *BMC Biol.* **8**, 97 (2010).
13. Clark, M. B. *et al.* The reality of pervasive transcription. *PLoS Biol.* **9**, e1000625; discussion e1001102 (2011).
14. Mattick, J. S. RNA regulation: a new genetics? *Nature Reviews Genetics* **5**, 316–323 (2004).
15. Berretta, J. & Morillon, A. Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. *EMBO Rep.* **10**, 973–982 (2009).
16. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature* **391**, 806–811 (1998).
17. Aravin, A. *et al.* A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* **442**, 203–207 (2006).
18. He, L. & Hannon, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics* **5**, 522–531 (2004).
19. Brennecke, J. *et al.* Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. *Cell* **128**, 1089–1103 (2007).
20. Carone, D. M. *et al.* A new class of retroviral and satellite encoded small RNAs emanates from mammalian centromeres. *Chromosoma* **118**, 113–125 (2009).
21. Cao, F. *et al.* Dicer independent small RNAs associate with telomeric heterochromatin. *RNA* **15**, 1274–1281 (2009).
22. Xie, Z. *et al.* Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS biology* **2**, e104 (2004).
23. Katiyar-Agarwal, S. *et al.* A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 18002–18007 (2006).

24. Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P. E., Sunkar, R. & Zhu, J. K. Endogenous siRNAs Derived from a Pair of Natural cis-Antisense Transcripts Regulate Salt Tolerance in Arabidopsis. *Cell* **123**, 1279–1291 (2005).
25. Henz, S. R. *et al.* Distinct expression patterns of natural antisense transcripts in Arabidopsis. *Plant physiology* **144**, 1247–1255 (2007).
26. Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology* **13**, 1097–1101 (2006).
27. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* **23**, 4051–4060 (2004).
28. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science Signalling* **294**, 853 (2001).
29. Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Vertebrate microRNA genes. *Science* **299**, 1540–1540 (2003).
30. Lee, R. C. & Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science Signalling* **294**, 862 (2001).
31. Lim, L. P. *et al.* The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development* **17**, 991–1008 (2003).
32. Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G. & Bartel, D. P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science Signalling* **294**, 858 (2001).
33. Aravin, A. A. *et al.* The Small RNA Profile during *Drosophila melanogaster* Development. *Developmental cell* **5**, 337–350 (2003).
34. Okamura, K., Hagen, J. W., Duan, H., Tyler, D. M. & Lai, E. C. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* **130**, 89–100 (2007).
35. Ruby, J. G., Jan, C. H. & Bartel, D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* **448**, 83–86 (2007).
36. Berezikov, E., Chung, W. J., Willis, J., Cuppen, E. & Lai, E. C. Mammalian mirtron genes. *Molecular cell* **28**, 328–336 (2007).
37. Kim, Y. K. & Kim, V. N. Processing of intronic microRNAs. *The EMBO journal* **26**, 775–783 (2007).
38. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. & Bradley, A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research* **14**, 1902–1910 (2004).
39. Baskerville, S. & Bartel, D. P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *Rna* **11**, 241–247 (2005).
40. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *nature* **425**, 415–419 (2003).
41. Morlando, M. *et al.* Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nature structural & molecular biology* **15**, 902–909 (2008).
42. Westholm, J. O. & Lai, E. C. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* **93**, 1897–1904 (2011).
43. Ladewig, E., Okamura, K., Flynt, A. S., Westholm, J. O. & Lai, E. C. Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Res.* **22**, 1634–1645 (2012).
44. Ketting, R. F. *et al.* Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & development* **15**, 2654–2659 (2001).
45. Knight, S. W. & Bass, B. L. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science Signalling* **293**, 2269 (2001).

46. Grishok, A. *et al.* Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs that Control *C. elegans* Developmental Timing. *Cell* **106**, 23–34 (2001).
47. Hutvagner, G. *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science Signalling* **293**, 834 (2001).
48. Aravin, A. A., Sachidanandam, R., Girard, A., Fejes-Toth, K. & Hannon, G. J. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science* **316**, 744–747 (2007).
49. Moazed, D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* **457**, 413–420 (2009).
50. Buker, S. M. *et al.* Two different Argonaute complexes are required for siRNA generation and heterochromatin assembly in fission yeast. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 200–207 (2007).
51. Bühler, M. & Moazed, D. Transcription and RNAi in heterochromatic gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1041–1048 (2007).
52. O'Donnell, K. A. & Boeke, J. D. Mighty Piwis defend the germline against genome intruders. *Cell* **129**, 37–44 (2007).
53. Aravin, A. A., Hannon, G. J. & Brennecke, J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* **318**, 761–764 (2007).
54. Aravin, A. A. & Bourc'his, D. Small RNA guides for de novo DNA methylation in mammalian germ cells. *Genes Dev.* **22**, 970–975 (2008).
55. Aravin, A. A. *et al.* A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol. Cell* **31**, 785–799 (2008).
56. La Salle, S. *et al.* Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. *BMC Dev. Biol.* **7**, 104 (2007).
57. Hata, K., Kusumi, M., Yokomine, T., Li, E. & Sasaki, H. Meiotic and epigenetic aberrations in Dnmt3L-deficient male germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 116–122 (2006).
58. Bestor, T. H. & Bourc'his, D. Transposon silencing and imprint establishment in mammalian germ cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **69**, 381–387 (2004).
59. Bourc'his, D., Xu, G. L., Lin, C. S., Bollman, B. & Bestor, T. H. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* **294**, 2536–2539 (2001).
60. Lee, H.-C. *et al.* *C. elegans* piRNAs mediate the genome-wide surveillance of germline transcripts. *Cell* **150**, 78–87 (2012).
61. Shirayama, M. *et al.* piRNAs initiate an epigenetic memory of nonself RNA in the *C. elegans* germline. *Cell* **150**, 65–77 (2012).
62. Frøkjaer-Jensen, C. *et al.* Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* **40**, 1375–1383 (2008).
63. Bessler, J. B., Andersen, E. C. & Villeneuve, A. M. Differential localization and independent acquisition of the H3K9me2 and H3K9me3 chromatin modifications in the *Caenorhabditis elegans* adult germ line. *PLoS Genet.* **6**, e1000830 (2010).
64. Zeng, Y. & Cullen, B. R. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *Rna* **9**, 112–123 (2003).
65. Doench, J. G., Petersen, C. P. & Sharp, P. A. siRNAs can function as miRNAs. *Genes & development* **17**, 438–442 (2003).
66. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**, 855–862 (1993).
67. Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J. A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**, 1931–1934 (2007).

68. Lai, E. C. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat. Genet.* **30**, 363–364 (2002).
69. Behm-Ansmant, I. *et al.* mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4: NOT deadenylase and DCP1: DCP2 decapping complexes. *Genes & development* **20**, 1885–1898 (2006).
70. Giraldez, A. J. *et al.* Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *science* **312**, 75–79 (2006).
71. Wu, L., Fan, J. & Belasco, J. G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4034–4039 (2006).
72. Taft, R. J. *et al.* Tiny RNAs associated with transcription start sites in animals. *Nature genetics* **41**, 572–578 (2009).
73. Seila, A. C. *et al.* Divergent transcription from active promoters. *Science* **322**, 1849–1851 (2008).
74. Preker, P. *et al.* RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters. *Science* **322**, 1851–1854 (2008).
75. O'Sullivan, J. M., Sontam, D. M., Grierson, R. & Jones, B. Repeated elements coordinate the spatial organization of the yeast genome. *Yeast* **26**, 125–138 (2009).
76. Taft, R. J., Kaplan, C. D., Simons, C. & Mattick, J. S. Evolution, biogenesis and function of promoter-associated RNAs. *Cell Cycle* **8**, 2332–2338 (2009).
77. Guttman, M. *et al.* Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* **458**, 223–227 (2009).
78. Kim, T.-K. *et al.* Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* **465**, 182–187 (2010).
79. Azzalin, C. M., Reichenbach, P., Khoriauli, L., Giulotto, E. & Lingner, J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* **318**, 798–801 (2007).
80. Luke, B. *et al.* The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **32**, 465–477 (2008).
81. Schoeftner, S. & Blasco, M. A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* **10**, 228–236 (2008).
82. Post-transcriptional processing generates a diversity of 5'-modified long and short RNAs. *Nature* **457**, 1028–1032 (2009).
83. Rinn, J. L. & Chang, H. Y. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 145–166 (2012).
84. Redon, S., Reichenbach, P. & Lingner, J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res.* **38**, 5797–5806 (2010).
85. López de Silanes, I., Stagno d'Alcontres, M. & Blasco, M. A. TERRA transcripts are bound by a complex array of RNA-binding proteins. *Nat Commun* **1**, 33 (2010).
86. Wang, H. *et al.* Dendritic BC1 RNA in translational control mechanisms. *J. Cell Biol.* **171**, 811–821 (2005).
87. Faghihi, M. A. *et al.* Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat. Med.* **14**, 723–730 (2008).
88. Gong, C. & Maquat, L. E. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature* **470**, 284–288 (2011).
89. Yoon, J.-H. *et al.* lincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol. Cell* **47**, 648–655 (2012).

90. Carrieri, C. *et al.* Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature* **491**, 454–457 (2012).
91. Cesana, M. *et al.* A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell* **147**, 358–369 (2011).
92. Faghihi, M. A. *et al.* Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome Biol.* **11**, R56 (2010).
93. Keniry, A. *et al.* The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nat. Cell Biol.* **14**, 659–665 (2012).
94. Zhao, J., Sun, B. K., Erwin, J. A., Song, J.-J. & Lee, J. T. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science* **322**, 750–756 (2008).
95. Tian, D., Sun, S. & Lee, J. T. The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell* **143**, 390–403 (2010).
96. Mattick, J. S. Long noncoding RNAs in cell and developmental biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 327 (2011).
97. Clark, M. B. & Mattick, J. S. Long noncoding RNAs in cell biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 366–376 (2011).
98. Yao, H. *et al.* Mediation of CTCF transcriptional insulation by DEAD-box RNA-binding protein p68 and steroid receptor RNA activator SRA. *Genes & development* **24**, 2543–2555 (2010).
99. Schmitz, K.-M., Mayer, C., Postepska, A. & Grummt, I. Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. *Genes & development* **24**, 2264–2269 (2010).
100. Pandey, R. R. *et al.* Kcnq1ot1 Antisense Noncoding RNA Mediates Lineage-Specific Transcriptional Silencing through Chromatin-Level Regulation. *Molecular cell* **32**, 232–246 (2008).
101. Kino, T., Hurt, D. E., Ichijo, T., Nader, N. & Chrousos, G. P. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest-and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Science signaling* **3**, ra8 (2010).
102. Huarte, M. *et al.* A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell* **142**, 409–419 (2010).
103. Khalil, A. M. *et al.* Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 11667–11672 (2009).
104. Rinn, J. L. *et al.* Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell* **129**, 1311–1323 (2007).
105. Ørom, U. A. *et al.* Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell* **143**, 46–58 (2010).
106. Hung, T. *et al.* Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nature genetics* **43**, 621–629 (2011).
107. Yap, K. L. *et al.* Molecular Interplay of the Noncoding RNA ANRIL and Methylated Histone H3 Lysine 27 by Polycomb CBX7 in Transcriptional Silencing of INK4a. *Molecular cell* **38**, 662–674 (2010).
108. Bernstein, E. *et al.* Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Molecular and cellular biology* **26**, 2560–2569 (2006).
109. Heo, J. B. & Sung, S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* **331**, 76–79 (2011).
110. Tripathi, V. *et al.* The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Molecular cell* **39**, 925–938 (2010).

111. Flynn, R. L. *et al.* TERRA and hnRNPA1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch on telomeric single-stranded DNA. *Nature* **471**, 532–536 (2011).
112. Røsok, Ø. & Sioud, M. Systematic identification of sense-antisense transcripts in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **22**, 104–108 (2004).
113. He, Y., Vogelstein, B., Velculescu, V. E., Papadopoulos, N. & Kinzler, K. W. The antisense transcriptomes of human cells. *Science* **322**, 1855–1857 (2008).
114. Aravind, L., Watanabe, H., Lipman, D. J. & Koonin, E. V. Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 11319–11324 (2000).
115. Drinnenberg, I. A. *et al.* RNAi in budding yeast. *Science* **326**, 544–550 (2009).
116. Drinnenberg, I. A., Fink, G. R. & Bartel, D. P. Compatibility with killer explains the rise of RNAi-deficient fungi. *Science* **333**, 1592 (2011).
117. Yuan, G.-C. *et al.* Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* **309**, 626–630 (2005).
118. Xu, Z. *et al.* Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast. *Nature* **457**, 1033–1037 (2009).
119. Neil, H. *et al.* Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature* **457**, 1038–1042 (2009).
120. Carroll, K. L., Ghirlando, R., Ames, J. M. & Corden, J. L. Interaction of yeast RNA-binding proteins Nrd1 and Nab3 with RNA polymerase II terminator elements. *RNA* **13**, 361–373 (2007).
121. Gudipati, R. K., Villa, T., Boulay, J. & Libri, D. Phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain dictates transcription termination choice. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 786–794 (2008).
122. Vasiljeva, L., Kim, M., Terzi, N., Soares, L. M. & Buratowski, S. Transcription termination and RNA degradation contribute to silencing of RNA polymerase II transcription within heterochromatin. *Mol. Cell* **29**, 313–323 (2008).
123. Vasiljeva, L. & Buratowski, S. Nrd1 interacts with the nuclear exosome for 3' processing of RNA polymerase II transcripts. *Mol. Cell* **21**, 239–248 (2006).
124. Birse, C. E., Minvielle-Sebastia, L., Lee, B. A., Keller, W. & Proudfoot, N. J. Coupling termination of transcription to messenger RNA maturation in yeast. *Science* **280**, 298–301 (1998).
125. Van Dijk, E. L. *et al.* XUTs are a class of Xrn1-sensitive antisense regulatory non-coding RNA in yeast. *Nature* **475**, 114–117 (2011).
126. Geisler, S., Lojek, L., Khalil, A. M., Baker, K. E. & Collier, J. Decapping of long noncoding RNAs regulates inducible genes. *Mol. Cell* **45**, 279–291 (2012).
127. Martens, J. A., Laprade, L. & Winston, F. Intergenic transcription is required to repress the *Saccharomyces cerevisiae* SER3 gene. *Nature* **429**, 571–574 (2004).
128. Hainer, S. J., Pruneski, J. A., Mitchell, R. D., Monteverde, R. M. & Martens, J. A. Intergenic transcription causes repression by directing nucleosome assembly. *Genes Dev.* **25**, 29–40 (2011).
129. Thiebaut, M. *et al.* Futile cycle of transcription initiation and termination modulates the response to nucleotide shortage in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* **31**, 671–682 (2008).
130. Kwapisz, M. *et al.* Mutations of RNA polymerase II activate key genes of the nucleoside triphosphate biosynthetic pathways. *EMBO J.* **27**, 2411–2421 (2008).
131. Berretta, J., Pinskaya, M. & Morillon, A. A cryptic unstable transcript mediates transcriptional trans-silencing of the Ty1 retrotransposon in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* **22**, 615–626 (2008).
132. Matsuda, E. & Garfinkel, D. J. Posttranslational interference of Ty1 retrotransposition by antisense RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 15657–15662 (2009).

133. Churchman, L. S. & Weissman, J. S. Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature* **469**, 368–373 (2011).
134. Yadon, A. N. *et al.* Chromatin remodeling around nucleosome-free regions leads to repression of noncoding RNA transcription. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5110–5122 (2010).
135. Jansen, A. & Verstrepen, K. J. Nucleosome positioning in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**, 301–320 (2011).
136. Tsankov, A. M., Thompson, D. A., Socha, A., Regev, A. & Rando, O. J. The role of nucleosome positioning in the evolution of gene regulation. *PLoS Biol.* **8**, e1000414 (2010).
137. Tsukiyama, T., Palmer, J., Landel, C. C., Shiloach, J. & Wu, C. Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **13**, 686–697 (1999).
138. Whitehouse, I., Rando, O. J., Delrow, J. & Tsukiyama, T. Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription. *Nature* **450**, 1031–1035 (2007).
139. Mavrich, T. N. *et al.* A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome Res.* **18**, 1073–1083 (2008).
140. Alén, C. *et al.* A role for chromatin remodeling in transcriptional termination by RNA polymerase II. *Mol. Cell* **10**, 1441–1452 (2002).
141. Camblong, J., Iglesias, N., Fickentscher, C., Dieppois, G. & Stutz, F. Antisense RNA stabilization induces transcriptional gene silencing via histone deacetylation in *S. cerevisiae*. *Cell* **131**, 706–717 (2007).
142. Deng, C. & Saunders, W. S. RIM4 encodes a meiotic activator required for early events of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* **266**, 497–504 (2001).
143. Kassir, Y., Granot, D. & Simchen, G. IME1, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* **52**, 853–862 (1988).
144. Mitchell, A. P. & Bowdish, K. S. Selection for early meiotic mutants in yeast. *Genetics* **131**, 65–72 (1992).
145. Van Werven, F. J. & Amon, A. Regulation of entry into gametogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **366**, 3521–3531 (2011).
146. Covitz, P. A. & Mitchell, A. P. Repression by the yeast meiotic inhibitor RME1. *Genes Dev.* **7**, 1598–1608 (1993).
147. Shimizu, M. *et al.* Genomic footprinting of the yeast zinc finger protein Rme1p and its roles in repression of the meiotic activator IME1. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2329–2336 (1998).
148. Covitz, P. A., Herskowitz, I. & Mitchell, A. P. The yeast RME1 gene encodes a putative zinc finger protein that is directly repressed by a1-alpha 2. *Genes Dev.* **5**, 1982–1989 (1991).
149. Mitchell, A. P. & Herskowitz, I. Activation of meiosis and sporulation by repression of the RME1 product in yeast. *Nature* **319**, 738–742 (1986).
150. Van Werven, F. J. *et al.* Transcription of two long noncoding RNAs mediates mating-type control of gametogenesis in budding yeast. *Cell* **150**, 1170–1181 (2012).
151. Lardenois, A. *et al.* Execution of the meiotic noncoding RNA expression program and the onset of gametogenesis in yeast require the conserved exosome subunit Rrp6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 1058–1063 (2011).
152. Kaplan, C. D., Laprade, L. & Winston, F. Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. *Science* **301**, 1096–1099 (2003).
153. Carrozza, M. J. *et al.* Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* **123**, 581–592 (2005).

154. Joshi, A. A. & Struhl, K. Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol. Cell* **20**, 971–978 (2005).
155. Drouin, S. *et al.* DSIF and RNA polymerase II CTD phosphorylation coordinate the recruitment of Rpd3S to actively transcribed genes. *PLoS Genet.* **6**, e1001173 (2010).
156. Govind, C. K. *et al.* Phosphorylated Pol II CTD recruits multiple HDACs, including Rpd3C(S), for methylation-dependent deacetylation of ORF nucleosomes. *Mol. Cell* **39**, 234–246 (2010).
157. Keogh, M.-C. *et al.* Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* **123**, 593–605 (2005).
158. Houseley, J., Kotovic, K., El Hage, A. & Tollervy, D. Trf4 targets ncRNAs from telomeric and rDNA spacer regions and functions in rDNA copy number control. *EMBO J.* **26**, 4996–5006 (2007).
159. Hongay, C. F., Grisafi, P. L., Galitski, T. & Fink, G. R. Antisense transcription controls cell fate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **127**, 735–745 (2006).
160. Gelfand, B. *et al.* Regulated antisense transcription controls expression of cell-type-specific genes in yeast. *Mol. Cell Biol.* **31**, 1701–1709 (2011).
161. Houseley, J., Rubbi, L., Grunstein, M., Tollervy, D. & Vogelauer, M. A ncRNA modulates histone modification and mRNA induction in the yeast GAL gene cluster. *Mol. Cell* **32**, 685–695 (2008).
162. Pinskaya, M., Gourvenec, S. & Morillon, A. H3 lysine 4 di- and tri-methylation deposited by cryptic transcription attenuates promoter activation. *EMBO J.* **28**, 1697–1707 (2009).
163. Bumgarner, S. L., Dowell, R. D., Grisafi, P., Gifford, D. K. & Fink, G. R. Toggle involving cis-interfering noncoding RNAs controls variegated gene expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 18321–18326 (2009).
164. Mooney, R. A., Darst, S. A. & Landick, R. Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol. Cell* **20**, 335–345 (2005).
165. Jin, D. J. & Cabrera, J. E. Coupling the distribution of RNA polymerase to global gene regulation and the dynamic structure of the bacterial nucleoid in *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.* **156**, 284–291 (2006).
166. Wassarman, K. M. & Saecker, R. M. Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. *Science* **314**, 1601–1603 (2006).
167. Shephard, L., Dobson, N. & Unrau, P. J. Binding and release of the 6S transcriptional control RNA. *RNA* **16**, 885–892 (2010).
168. Beckmann, B. M. *et al.* A pRNA-induced structural rearrangement triggers 6S-1 RNA release from RNA polymerase in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* **31**, 1727–1738 (2012).
169. Beckmann, B. M. *et al.* In vivo and in vitro analysis of 6S RNA-templated short transcripts in *Bacillus subtilis*. *RNA Biol* **8**, 839–849 (2011).
170. Cavanagh, A. T., Sperger, J. M. & Wassarman, K. M. Regulation of 6S RNA by pRNA synthesis is required for efficient recovery from stationary phase in *E. coli* and *B. subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **40**, 2234–2246 (2012).
171. Steuten, B. & Wagner, R. A conformational switch is responsible for the reversal of the 6S RNA-dependent RNA polymerase inhibition in *Escherichia coli*. *Biol. Chem.* (2012). doi:10.1515/hsz-2012-0237
172. Panchapakesan, S. S. S. & Unrau, P. J. *E. coli* 6S RNA release from RNA polymerase requires $\sigma 70$ ejection by scrunching and is orchestrated by a conserved RNA hairpin. *RNA* **18**, 2251–2259 (2012).
173. Babitzke, P. & Romeo, T. CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 156–163 (2007).

174. Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H.-T. & Haas, D. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol. Microbiol.* **67**, 241–253 (2008).
175. Vanderpool, C. K. & Gottesman, S. Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol. Microbiol.* **54**, 1076–1089 (2004).
176. Vanderpool, C. K. & Gottesman, S. The novel transcription factor SgrR coordinates the response to glucose-phosphate stress. *J. Bacteriol.* **189**, 2238–2248 (2007).
177. Licht, A., Preis, S. & Brantl, S. Implication of CcpN in the regulation of a novel untranslated RNA (SR1) in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **58**, 189–206 (2005).
178. Heidrich, N., Chinali, A., Gerth, U. & Brantl, S. The small untranslated RNA SR1 from the *Bacillus subtilis* genome is involved in the regulation of arginine catabolism. *Mol. Microbiol.* **62**, 520–536 (2006).
179. Heidrich, N., Moll, I. & Brantl, S. In vitro analysis of the interaction between the small RNA SR1 and its primary target *ahrC* mRNA. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4331–4346 (2007).
180. Massé, E., Vanderpool, C. K. & Gottesman, S. Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 6962–6971 (2005).
181. Massé, E., Salvail, H., Desnoyers, G. & Arguin, M. Small RNAs controlling iron metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 140–145 (2007).
182. Walsh, N. P., Alba, B. M., Bose, B., Gross, C. A. & Sauer, R. T. OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* **113**, 61–71 (2003).
183. Ades, S. E. Proteolysis: Adaptor, adaptor, catch me a catch. *Curr. Biol.* **14**, R924–926 (2004).
184. Valentin-Hansen, P., Johansen, J. & Rasmussen, A. A. Small RNAs controlling outer membrane porins. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 152–155 (2007).
185. Beisel, C. L. & Storz, G. Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 866–882 (2010).
186. Beisel, C. L. & Storz, G. Discriminating tastes: physiological contributions of the Hfq-binding small RNA Spot 42 to catabolite repression. *RNA Biol* **8**, 766–770 (2011).
187. Beisel, C. L. & Storz, G. The base-pairing RNA spot 42 participates in a multioutput feedforward loop to help enact catabolite repression in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* **41**, 286–297 (2011).
188. Argaman, L. & Altuvia, S. *fhlA* repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex. *J. Mol. Biol.* **300**, 1101–1112 (2000).
189. Geissmann, T. A. & Touati, D. Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J.* **23**, 396–405 (2004).
190. Kawamoto, H., Koide, Y., Morita, T. & Aiba, H. Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq. *Mol. Microbiol.* **61**, 1013–1022 (2006).
191. Brantl, S. & Wagner, E. G. H. An antisense RNA-mediated transcriptional attenuation mechanism functions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 2740–2747 (2002).
192. Aiba, H. Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 134–139 (2007).
193. Maki, K., Uno, K., Morita, T. & Aiba, H. RNA, but not protein partners, is directly responsible for translational silencing by a bacterial Hfq-binding small RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 10332–10337 (2008).

194. Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., St John, K. & Gottesman, S. Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol. Microbiol.* **39**, 1382–1394 (2001).
195. Kawano, M., Aravind, L. & Storz, G. An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Mol. Microbiol.* **64**, 738–754 (2007).
196. Babitzke, P., Baker, C. S. & Romeo, T. Regulation of translation initiation by RNA binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 27–44 (2009).
197. Yakhnin, H. *et al.* CsrA of *Bacillus subtilis* regulates translation initiation of the gene encoding the flagellin protein (hag) by blocking ribosome binding. *Mol. Microbiol.* **64**, 1605–1620 (2007).
198. Baker, C. S. *et al.* CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli* hfq by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *J. Bacteriol.* **189**, 5472–5481 (2007).
199. Novick, R. P., Iordanescu, S., Projan, S. J., Kornblum, J. & Edelman, I. pT181 plasmid replication is regulated by a countertranscript-driven transcriptional attenuator. *Cell* **59**, 395–404 (1989).
200. Brantl, S. & Wagner, E. G. Antisense RNA-mediated transcriptional attenuation: an in vitro study of plasmid pT181. *Mol. Microbiol.* **35**, 1469–1482 (2000).
201. Brantl, S. & Wagner, E. G. Dual function of the copR gene product of plasmid pIP501. *J. Bacteriol.* **179**, 7016–7024 (1997).
202. Brantl, S. & Wagner, E. G. An unusually long-lived antisense RNA in plasmid copy number control: in vivo RNAs encoded by the streptococcal plasmid pIP501. *J. Mol. Biol.* **255**, 275–288 (1996).
203. Brantl, S. & Wagner, E. G. Antisense RNA-mediated transcriptional attenuation occurs faster than stable antisense/target RNA pairing: an in vitro study of plasmid pIP501. *EMBO J.* **13**, 3599–3607 (1994).
204. Brantl, S., Birch-Hirschfeld, E. & Behnke, D. RepR protein expression on plasmid pIP501 is controlled by an antisense RNA-mediated transcription attenuation mechanism. *J. Bacteriol.* **175**, 4052–4061 (1993).
205. Wagner, E. G. & Brantl, S. Kissing and RNA stability in antisense control of plasmid replication. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 451–454 (1998).
206. Silvaggi, J. M., Perkins, J. B. & Losick, R. Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **187**, 6641–6650 (2005).
207. Opdyke, J. A., Kang, J.-G. & Storz, G. GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 6698–6705 (2004).
208. Opdyke, J. A., Fozo, E. M., Hemm, M. R. & Storz, G. RNase III participates in GadY-dependent cleavage of the gadX-gadW mRNA. *J. Mol. Biol.* **406**, 29–43 (2011).
209. Sun, W., Pertzov, A. & Nicholson, A. W. Catalytic mechanism of *Escherichia coli* ribonuclease III: kinetic and inhibitor evidence for the involvement of two magnesium ions in RNA phosphodiester hydrolysis. *Nucleic Acids Res.* **33**, 807–815 (2005).
210. Pertzov, A. V. & Nicholson, A. W. Characterization of RNA sequence determinants and antideterminants of processing reactivity for a minimal substrate of *Escherichia coli* ribonuclease III. *Nucleic Acids Res.* **34**, 3708–3721 (2006).
211. Meng, W., Nicholson, R. H., Nathania, L., Pertzov, A. V. & Nicholson, A. W. New approaches to understanding double-stranded RNA processing by ribonuclease III purification and assays of homodimeric and heterodimeric forms of RNase III from bacterial extremophiles and mesophiles. *Meth. Enzymol.* **447**, 119–129 (2008).
212. Khemici, V. & Carpousis, A. J. The RNA degradosome and poly(A) polymerase of *Escherichia coli* are required in vivo for the degradation of small mRNA decay intermediates containing REP-stabilizers. *Mol. Microbiol.* **51**, 777–790 (2004).

213. Vanzo, N. F. *et al.* Ribonuclease E organizes the protein interactions in the Escherichia coli RNA degradosome. *Genes Dev.* **12**, 2770–2781 (1998).
214. Khemici, V., Toesca, I., Poljak, L., Vanzo, N. F. & Carpousis, A. J. The RNase E of Escherichia coli has at least two binding sites for DEAD-box RNA helicases: functional replacement of RhlB by RhlE. *Mol. Microbiol.* **54**, 1422–1430 (2004).
215. Papenfort, K. *et al.* σ E-dependent small RNAs of Salmonella respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay. *Molecular microbiology* **62**, 1674–1688 (2006).
216. Guillier, M. & Gottesman, S. The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator. *Nucleic acids research* **36**, 6781–6794 (2008).
217. Obana, N., Shirahama, Y., Abe, K. & Nakamura, K. Stabilization of Clostridium perfringens collagenase mRNA by VR-RNA-dependent cleavage in 5' leader sequence. *Molecular microbiology* **77**, 1416–1428 (2010).
218. Chandran, V. *et al.* Recognition and cooperation between the ATP-dependent RNA helicase RhlB and ribonuclease RNase E. *J. Mol. Biol.* **367**, 113–132 (2007).
219. Ait-Bara, S. & Carpousis, A. J. Characterization of the RNA degradosome of Pseudoalteromonas haloplanktis: conservation of the RNase E-RhlB interaction in the gammaproteobacteria. *J. Bacteriol.* **192**, 5413–5423 (2010).
220. Carpousis, A. J., Luisi, B. F. & McDowall, K. J. Endonucleolytic initiation of mRNA decay in Escherichia coli. *Prog Mol Biol Transl Sci* **85**, 91–135 (2009).
221. Carpousis, A. J., Khemici, V. & Poljak, L. Assaying DEAD-box RNA helicases and their role in mRNA degradation in Escherichia coli. *Meth. Enzymol.* **447**, 183–197 (2008).
222. Carpousis, A. J., Khemici, V., Ait-Bara, S. & Poljak, L. Co-immunopurification of multiprotein complexes containing RNA-degrading enzymes. *Meth. Enzymol.* **447**, 65–82 (2008).
223. Carpousis, A. J. The RNA degradosome of Escherichia coli: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 71–87 (2007).
224. Bouvier, M. & Carpousis, A. J. A tale of two mRNA degradation pathways mediated by RNase E. *Mol. Microbiol.* **82**, 1305–1310 (2011).
225. Khemici, V., Poljak, L., Toesca, I. & Carpousis, A. J. Evidence in vivo that the DEAD-box RNA helicase RhlB facilitates the degradation of ribosome-free mRNA by RNase E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 6913–6918 (2005).
226. Callaghan, A. J. *et al.* Studies of the RNA degradosome-organizing domain of the Escherichia coli ribonuclease RNase E. *J. Mol. Biol.* **340**, 965–979 (2004).
227. Chae, J., Kim, Y. C. & Cho, Y. Crystal structure of the NurA-dAMP-Mn²⁺ complex. *Nucleic Acids Res.* **40**, 2258–2270 (2012).
228. Linares, J. F. *et al.* The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in Pseudomonas aeruginosa. *Environ. Microbiol.* **12**, 3196–3212 (2010).
229. Moreno, R., Fonseca, P. & Rojo, F. Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to sequester the Crc global regulator in Pseudomonas putida, modulating catabolite repression. *Mol. Microbiol.* **83**, 24–40 (2012).
230. Moreno, R., Fonseca, P. & Rojo, F. The Crc global regulator inhibits the Pseudomonas putida pWW0 toluene/xylene assimilation pathway by repressing the translation of regulatory and structural genes. *J. Biol. Chem.* **285**, 24412–24419 (2010).
231. Moreno, R., Marzi, S., Romby, P. & Rojo, F. The Crc global regulator binds to an unpaired A-rich motif at the Pseudomonas putida alkS mRNA coding sequence and inhibits translation initiation. *Nucleic Acids Res.* **37**, 7678–7690 (2009).

232. Sonnleitner, E. *et al.* Novel targets of the CbrAB/Crc carbon catabolite control system revealed by transcript abundance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* **7**, e44637 (2012).
233. Sonnleitner, A., Fleischer, S. & Schindler, H. Gating of the skeletal calcium release channel by ATP is inhibited by protein phosphatase 1 but not by Mg²⁺. *Cell Calcium* **21**, 283–290 (1997).
234. Sonnleitner, E. & Haas, D. Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 63–79 (2011).
235. Storz, G., Vogel, J. & Wassarman, K. M. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol. Cell* **43**, 880–891 (2011).
236. Suzuki, K., Babitzke, P., Kushner, S. R. & Romeo, T. Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev.* **20**, 2605–2617 (2006).
237. Trotochaud, A. E. & Wassarman, K. M. A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 313–319 (2005).
238. Trotochaud, A. E. & Wassarman, K. M. 6S RNA function enhances long-term cell survival. *J. Bacteriol.* **186**, 4978–4985 (2004).
239. Barrick, J. E., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Ruzzo, W. L. & Breaker, R. R. 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter. *RNA* **11**, 774–784 (2005).
240. Wassarman, K. M. & Storz, G. 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell* **101**, 613–623 (2000).
241. Cavanagh, A. T., Klocko, A. D., Liu, X. & Wassarman, K. M. Promoter specificity for 6S RNA regulation of transcription is determined by core promoter sequences and competition for region 4.2 of sigma⁷⁰. *Mol. Microbiol.* **67**, 1242–1256 (2008).
242. Neusser, T., Polen, T., Geissen, R. & Wagner, R. Depletion of the non-coding regulatory 6S RNA in *E. coli* causes a surprising reduction in the expression of the translation machinery. *BMC Genomics* **11**, 165 (2010).
243. Weissenmayer, B. A., Prendergast, J. G. D., Lohan, A. J. & Loftus, B. J. Sequencing illustrates the transcriptional response of *Legionella pneumophila* during infection and identifies seventy novel small non-coding RNAs. *PLoS ONE* **6**, e17570 (2011).
244. Faucher, S. P. & Shuman, H. A. Small Regulatory RNA and *Legionella pneumophila*. *Front Microbiol* **2**, 98 (2011).
245. Faucher, S. P., Friedlander, G., Livny, J., Margalit, H. & Shuman, H. A. *Legionella pneumophila* 6S RNA optimizes intracellular multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 7533–7538 (2010).
246. Gildehaus, N., Neusser, T., Wurm, R. & Wagner, R. Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of in vitro transcription and synthesis of RNA-directed de novo transcripts. *Nucleic Acids Res.* **35**, 1885–1896 (2007).
247. Wassarman, K. M. 6S RNA: a regulator of transcription. *Mol. Microbiol.* **65**, 1425–1431 (2007).
248. She, Q. *et al.* Genetic profile of pNOB8 from *Sulfolobus*: the first conjugative plasmid from an archaeon. *Extremophiles* **2**, 417–425 (1998).
249. Sorek, R., Kunin, V. & Hugenoltz, P. CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 181–186 (2008).
250. Horvath, P. & Barrangou, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* **327**, 167–170 (2010).
251. Waters, L. S. & Storz, G. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**, 615–628 (2009).

252. Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* **1**, 7 (2006).
253. Romby, P. & Charpentier, E. An overview of RNAs with regulatory functions in gram-positive bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 217–237 (2010).
254. Jansen, R., Embden, J. D. A. van, Gaastra, W. & Schouls, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **43**, 1565–1575 (2002).
255. Brouns, S. J. J. *et al.* Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* **321**, 960–964 (2008).
256. Carte, J., Pfister, N. T., Compton, M. M., Terns, R. M. & Terns, M. P. Binding and cleavage of CRISPR RNA by Cas6. *RNA* **16**, 2181–2188 (2010).
257. Carte, J., Wang, R., Li, H., Terns, R. M. & Terns, M. P. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev.* **22**, 3489–3496 (2008).
258. Marraffini, L. A. & Sontheimer, E. J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* **322**, 1843–1845 (2008).
259. Ivančić-Baće, I., Howard, J. A. L. & Bolt, E. L. Tuning in to interference: R-loops and cascade complexes in CRISPR immunity. *J. Mol. Biol.* **422**, 607–616 (2012).
260. Howard, J. A. L., Delmas, S., Ivančić-Baće, I. & Bolt, E. L. Helicase dissociation and annealing of RNA-DNA hybrids by *Escherichia coli* Cas3 protein. *Biochem. J.* **439**, 85–95 (2011).
261. Schonrock, N. & Götz, J. Decoding the non-coding RNAs in Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 3543–3559 (2012).
262. Tal, T. L. & Tanguay, R. L. Non-coding RNAs--novel targets in neurotoxicity. *Neurotoxicology* **33**, 530–544 (2012).
263. Perera, R. J. & Ray, A. Epigenetic regulation of miRNA genes and their role in human melanomas. *Epigenomics* **4**, 81–90 (2012).
264. Jayaraman, S. Epigenetics of autoimmune diabetes. *Epigenomics* **3**, 639–648 (2011).
265. Prensner, J. R. & Chinnaiyan, A. M. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov* **1**, 391–407 (2011).
266. Rederstorff, M. & Hüttenhofer, A. Small non-coding RNAs in disease development and host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **12**, 684–694 (2010).
267. Da Costa Martins, P. A., Leptidis, S., Salic, K. & De Windt, L. J. MicroRNA regulation in cardiovascular disease. *Curr Drug Targets* **11**, 900–906 (2010).
268. Taft, R. J., Pang, K. C., Mercer, T. R., Dinger, M. & Mattick, J. S. Non-coding RNAs: regulators of disease. *J. Pathol.* **220**, 126–139 (2010).
269. Gibb, E. A., Brown, C. J. & Lam, W. L. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol. Cancer* **10**, 38 (2011).
270. Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260 (1997).
271. Huisinga, K. L., Brower-Toland, B. & Elgin, S. C. R. The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma* **115**, 110–122 (2006).
272. Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074–1080 (2001).
273. Kouzarides, T. SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell* **131**, 822 (2007).
274. Kirmizis, A. *et al.* Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature* **449**, 928–932 (2007).

275. Shilatifard, A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 243–269 (2006).
276. Kim, J. *et al.* Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep.* **7**, 397–403 (2006).
277. Taverna, S. D., Li, H., Ruthenburg, A. J., Allis, C. D. & Patel, D. J. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1025–1040 (2007).
278. Lee, J.-S. *et al.* Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell* **131**, 1084–1096 (2007).
279. Dalvoy Vasudevarao, M., Dhanasekaran, K., Selvi, R. B. & Kundu, T. K. Inhibition of acetyltransferase alters different histone modifications: probed by small molecule inhibitor plumbagin. *J. Biochem.* **152**, 453–462 (2012).
280. Lau, P. N. I. & Cheung, P. Elucidating combinatorial histone modifications and crosstalks by coupling histone-modifying enzyme with biotin ligase activity. *Nucleic Acids Res.* (2012). doi:10.1093/nar/gks1247
281. Balaji, Muthiah, R., Sabarinath, Ramamurthy & Chandrasekharan. Descriptor analysis of estrogen receptor β -selective ligands using 2-phenylquinoline, tetrahydrofluorenone and 3-hydroxy 6H-benzo[c]chromen-6-one scaffolds. *J Enzyme Inhib Med Chem* **26**, 831–842 (2011).
282. Chandrasekharan, M. B., Huang, F. & Sun, Z.-W. Decoding the trans-histone crosstalk: methods to analyze H2B ubiquitination, H3 methylation and their regulatory factors. *Methods* **54**, 304–314 (2011).
283. Lee, J.-S., Smith, E. & Shilatifard, A. The language of histone crosstalk. *Cell* **142**, 682–685 (2010).
284. Suganuma, T. & Workman, J. L. Crosstalk among Histone Modifications. *Cell* **135**, 604–607 (2008).
285. Buggy, J. J. *et al.* Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem. J.* **350 Pt 1**, 199–205 (2000).
286. Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. & Beppu, T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**, 17174–17179 (1990).
287. Allfrey, V. G. & Mirsky, A. E. Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science* **144**, 559 (1964).
288. ALLFREY, V. G., FAULKNER, R. & MIRSKY, A. E. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **51**, 786–794 (1964).
289. Durrin, L. K., Mann, R. K., Kayne, P. S. & Grunstein, M. Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation in vivo. *Cell* **65**, 1023–1031 (1991).
290. Frye, R. A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 793–798 (2000).
291. Rundlett, S. E. *et al.* HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 14503–14508 (1996).
292. Finnin, M. S. *et al.* Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **401**, 188–193 (1999).
293. Ekwall, K. Genome-wide analysis of HDAC function. *Trends Genet.* **21**, 608–615 (2005).
294. Vidal, M., Buckley, A. M., Hilger, F. & Gaber, R. F. Direct selection for mutants with increased K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **125**, 313–320 (1990).

295. Vidal, M. & Gaber, R. F. RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 6317–6327 (1991).
296. Robyr, D. *et al.* Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* **109**, 437–446 (2002).
297. Bernstein, B. E., Tong, J. K. & Schreiber, S. L. Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 13708–13713 (2000).
298. Robyr, D., Kurdistani, S. K. & Grunstein, M. Analysis of genome-wide histone acetylation state and enzyme binding using DNA microarrays. *Meth. Enzymol.* **376**, 289–304 (2004).
299. Suka, N., Suka, Y., Carmen, A. A., Wu, J. & Grunstein, M. Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Mol. Cell* **8**, 473–479 (2001).
300. Yang, X.-J. & Seto, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 206–218 (2008).
301. McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Lu, J. & Olson, E. N. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* **408**, 106–111 (2000).
302. Verdin, E., Dequiedt, F. & Kasler, H. G. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* **19**, 286–293 (2003).
303. Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T. & Oehme, I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett.* **277**, 8–21 (2009).
304. Hubbert, C. *et al.* HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455–458 (2002).
305. Kovacs, J. J. *et al.* HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol. Cell* **18**, 601–607 (2005).
306. Kawaguchi, Y. *et al.* The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* **115**, 727–738 (2003).
307. Pandey, U. B. *et al.* HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* **447**, 859–863 (2007).
308. Carmen, A. A., Rundlett, S. E. & Grunstein, M. HDA1 and HDA3 are components of a yeast histone deacetylase (HDA) complex. *J. Biol. Chem.* **271**, 15837–15844 (1996).
309. Wu, J., Suka, N., Carlson, M. & Grunstein, M. TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Mol. Cell* **7**, 117–126 (2001).
310. Rine, J. & Herskowitz, I. Four Genes Responsible for a Position Effect on Expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **116**, 9–22 (1987).
311. Braunstein, M., Rose, A. B., Holmes, S. G., Allis, C. D. & Broach, J. R. Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes & development* **7**, 592–604 (1993).
312. Imai, S. I., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. & Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795–799 (2000).
313. Suka, N., Luo, K. & Grunstein, M. Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nature genetics* **32**, 378–383 (2002).
314. Borra, M. T., Langer, M. R., Slama, J. T. & Denu, J. M. Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases. *Biochemistry* **43**, 9877–9887 (2004).
315. Brachmann, C. B. *et al.* The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes & development* **9**, 2888–2902 (1995).

316. Perrod, S. *et al.* A cytosolic NAD-dependent deacetylase, Hst2p, can modulate nucleolar and telomeric silencing in yeast. *The EMBO journal* **20**, 197–209 (2001).
317. Pijnappel, W. W. M. *et al.* The *S. cerevisiae* SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Genes & development* **15**, 2991–3004 (2001).
318. Kim, T., Xu, Z., Clauder-Münster, S., Steinmetz, L. M. & Buratowski, S. Set3 HDAC Mediates Effects of Overlapping Noncoding Transcription on Gene Induction Kinetics. *Cell* **150**, 1158–1169 (2012).
319. Suzuki, K. *et al.* Closed Chromatin Architecture Is Induced by an RNA Duplex Targeting the HIV-1 Promoter Region. *J. Biol. Chem.* **283**, 23353–23363 (2008).
320. Turner, A.-M. W., De La Cruz, J. & Morris, K. V. Mobilization-competent Lentiviral Vector-mediated Sustained Transcriptional Modulation of HIV-1 Expression. *Molecular Therapy* **17**, 360–368 (2008).
321. Hawkins, P. G., Santoso, S., Adams, C., Anest, V. & Morris, K. V. Promoter targeted small RNAs induce long-term transcriptional gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Research* **37**, 2984–2995 (2009).
322. Lim, H. G., Suzuki, K., Cooper, D. A. & Kelleher, A. D. Promoter-targeted siRNAs Induce Gene Silencing of Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Infection In Vitro. *Molecular Therapy* **16**, 565–570 (2007).
323. Camblong, J. *et al.* Trans-acting antisense RNAs mediate transcriptional gene cosuppression in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* **23**, 1534–1545 (2009).
324. Trésaugues, L. *et al.* Structural characterization of Set1 RNA recognition motifs and their role in histone H3 lysine 4 methylation. *Journal of molecular biology* **359**, 1170–1181 (2006).
325. Cohen, B. D., Sertil, O., Abramova, N. E., Davies, K. J. A. & Lowry, C. V. Induction and repression of DAN1 and the family of anaerobic mannoprotein genes in *Saccharomyces cerevisiae* occurs through a complex array of regulatory sites. *Nucleic acids research* **29**, 799–808 (2001).
326. Kitagaki, H., Shimoi, H. & Itoh, K. Identification and Analysis of a Static Culture-Specific Cell Wall Protein, Tir1p/Srp1p in *Saccharomyces Cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **249**, 343–349 (2004).
327. Kowalski, L. R. Z., Kondo, K. & Inouye, M. Cold-shock induction of a family of TIP1-related proteins associated with the membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* **15**, 341–353 (2006).
328. Bourdineaud, J. P. At acidic pH, the GPA2–cAMP pathway is necessary to counteract the ORD1-mediated repression of the hypoxic SRP1/TIR1 yeast gene. *Yeast* **18**, 841–848 (2001).
329. Sertil, O., Cohen, B. D., Davies, K. J. & Lowry, C. V. The DAN1 gene of *S. cerevisiae* is regulated in parallel with the hypoxic genes, but by a different mechanism. *Gene* **192**, 199–205 (1997).
330. Lowry, C. V., Weiss, J. L., Walthall, D. A. & Zitomer, R. S. Modulator sequences mediate oxygen regulation of CYC1 and a neighboring gene in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 151–155 (1983).
331. Lowry, C. V. & Zitomer, R. S. Oxygen regulation of anaerobic and aerobic genes mediated by a common factor in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 6129–6133 (1984).
332. Lowry, C. V. & Zitomer, R. S. ROX1 encodes a heme-induced repression factor regulating ANB1 and CYC7 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4651–4658 (1988).

333. Zagorec, M. *et al.* Isolation, sequence, and regulation by oxygen of the yeast HEM13 gene coding for coproporphyrinogen oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 9718–9724 (1988).
334. Hodge, M. R., Singh, K. & Cumsky, M. G. Upstream activation and repression elements control transcription of the yeast COX5b gene. *Molecular and cellular biology* **10**, 5510–5520 (1990).
335. Nehlin, J. O., Carlberg, M. & Ronne, H. Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *The EMBO journal* **10**, 3373 (1991).
336. Huang, M., Zhou, Z. & Elledge, S. J. The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* **94**, 595–605 (1998).
337. Johnson, A. D. & Herskowitz, I. A repressor (MAT alpha 2 Product) and its operator control expression of a set of cell type specific genes in yeast. *Cell* **42**, 237 (1985).
338. Komachi, K., Redd, M. J. & Johnson, A. D. The WD repeats of Tup1 interact with the homeo domain protein alpha 2. *Genes & development* **8**, 2857–2867 (1994).
339. Park, S. H., Koh, S. S., Chun, J. H., Hwang, H. J. & Kang, H. S. Nrg1 Is a Transcriptional Repressor for Glucose Repression of STA1 Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **19**, 2044–2050 (1999).
340. Proft, M. & Serrano, R. Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Molecular and cellular biology* **19**, 537–546 (1999).
341. Crisp, R. J., Adkins, E. M., Kimmel, E. & Kaplan, J. Recruitment of Tup1p and Cti6p regulates heme-deficient expression of Aft1p target genes. *The EMBO journal* **25**, 512–521 (2006).
342. Xia, Z., Turner, G. C., Hwang, C. S., Byrd, C. & Varshavsky, A. Amino acids induce peptide uptake via accelerated degradation of CUP9, the transcriptional repressor of the PTR2 peptide transporter. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 28958–28968 (2008).
343. Balasubramanian, B., Lowry, C. V. & Zitomer, R. S. The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a high-mobility-group motif. *Molecular and cellular biology* **13**, 6071–6078 (1993).
344. Edmondson, D. G., Smith, M. M. & Roth, S. Y. Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes & development* **10**, 1247–1259 (1996).
345. Watson, A. D. *et al.* Ssn6–Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression. *Genes & development* **14**, 2737–2744 (2000).
346. Davie, J. K., Edmondson, D. G., Coco, C. B. & Dent, S. Y. R. Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 50158–50162 (2003).
347. Wu, J., Suka, N., Carlson, M. & Grunstein, M. TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Molecular cell* **7**, 117–126 (2001).
348. Green, S. R. & Johnson, A. D. Promoter-dependent roles for the Srb10 cyclin-dependent kinase and the Hda1 deacetylase in Tup1-mediated repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* **15**, 4191–4202 (2004).
349. Malavé, T. M. & Dent, S. Y. R. Transcriptional repression by Tup1-Ssn6. *Biochem. Cell Biol.* **84**, 437–443 (2006).
350. Snoek, I. S. I., Tai, S. L., Pronk, J. T., Yde Steensma, H. & Daran, J.-M. Involvement of Snf7p and Rim101p in the transcriptional regulation of TIR1 and other anaerobically upregulated genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **10**, 367–384 (2010).

351. Castro-Prego, R. *et al.* Ixr1p regulates oxygen-dependent HEM13 transcription. *FEMS yeast research* **10**, 309–321 (2010).
352. Vizoso-Vázquez, Á. *et al.* Ixr1p and the control of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic response. *Applied microbiology and biotechnology* 1–12 (2012).
353. Johnson, A. W. Rat1p and Xrn1p are functionally interchangeable exoribonucleases that are restricted to and required in the nucleus and cytoplasm, respectively. *Molecular and cellular biology* **17**, 6122–6130 (1997).
354. Dai, J. *et al.* Probing nucleosome function: a highly versatile library of synthetic histone H3 and H4 mutants. *Cell* **134**, 1066–1078 (2008).
355. Kaluarachchi Duffy, S. *et al.* Exploring the yeast acetylome using functional genomics. *Cell* **149**, 936–948 (2012).
356. Dutrow, N. *et al.* Dynamic transcriptome of *Schizosaccharomyces pombe* shown by RNA-DNA hybrid mapping. *Nature Genetics* **40**, 977–986 (2008).
357. Kinney, J. S., Viscidi, R. P., Vonderfecht, S. L., Eiden, J. J. & Yolken, R. H. Monoclonal antibody assay for detection of double-stranded RNA and application for detection of group A and non-group A rotaviruses. *Journal of clinical microbiology* **27**, 6–12 (1989).
358. Chávez, S. *et al.* A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **19**, 5824–5834 (2000).
359. Gómez-González, B. *et al.* Genome-wide function of THO/TREX in active genes prevents R-loop-dependent replication obstacles. *EMBO J.* **30**, 3106–3119 (2011).
360. Gómez-González, B., Felipe-Abrio, I. & Aguilera, A. The S-phase checkpoint is required to respond to R-loops accumulated in THO mutants. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5203–5213 (2009).
361. Gómez-González, B. & Aguilera, A. R-loops do not accumulate in transcription-defective hpr1-101 mutants: implications for the functional role of THO/TREX. *Nucleic Acids Res.* **37**, 4315–4321 (2009).
362. Rondón, A. G., Jimeno, S., García-Rubio, M. & Aguilera, A. Molecular evidence that the eukaryotic THO/TREX complex is required for efficient transcription elongation. *J. Biol. Chem.* **278**, 39037–39043 (2003).
363. Mischo, H. E. *et al.* Yeast Sen1 helicase protects the genome from transcription-associated instability. *Mol. Cell* **41**, 21–32 (2011).
364. Rhee, H. S. & Pugh, B. F. Comprehensive Genome-wide Protein-DNA Interactions Detected at Single-Nucleotide Resolution. *Cell* **147**, 1408–1419 (2011).
365. Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T. & Kanemaki, M. An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nature Methods* **6**, 917–922 (2009).
366. Zofall, M. *et al.* RNA Elimination Machinery Targeting Meiotic mRNAs Promotes Facultative Heterochromatin Formation. *Science* **335**, 96–100 (2012).
367. Lorenz, D. R. *et al.* CENP-B Cooperates with Set1 in Bidirectional Transcriptional Silencing and Genome Organization of Retrotransposons. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 4215–4225 (2012).