

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET LA SANTE
UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE
FACULTE DES SCIENCES DE LUMINY

THESE

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE

Spécialité: Génétique

Présentée et soutenue publiquement par

Laetitia Maestroni

le 14 décembre 2011

Recrutement de l'hélicase Pif1 par la protéine de réplication RPA durant la
réplication et aux cassures double-brins de l'ADN.

Etude fonctionnelle de l'Histone méthyltransférase Set1 dans
la régulation de la taille des télomères
chez *Saccharomyces cerevisiae*

Directeur de thèse: Dr. Vincent Géli

JURY

Pr. Denise Aragnol, *Université de la méditerranée, Marseille*

Dr. Philippe Pasero, *IGH, Montpellier*

Pr. Eric Gilson, *LBPG, Nice*

Dr. Judith Lopes, *Institut Curie, Paris*

Dr. Vincent Géli, *IGC, Marseille*

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Au terme de ces 4 années de doctorat et de ces 10 années d'étude, voici le moment des remerciements...

*Je souhaite tout d'abord remercier le **Pr Eric Gilson**, le **Dr. Philippe Pasero**, le **Dr. Judith Lopes** et le **Pr. Denise Aragnol**. pour avoir accepté de faire parti de mon jury et d'évaluer mon travail de thèse.*

*Je remercie **Vincent Géli** de m'avoir accueillie dans son équipe dès mon stage de Master et de m'avoir permis d'y effectuer ma thèse. Merci pour ses conseils, son soutien, et son initiation au monde passionnant des télomères.*

*Je remercie le **Dr. Robert Fuchs** pour m'avoir accueillie au sein de l'unité IGC.*



*Merci à **Marie-Noëlle**, pour avoir donné de ton temps pour lire le manuscrit, pour tes conseils toujours très judicieux et pour ton soutien. Merci également pour ton aide notamment sur les manip de résection.*

*Merci à **Pierre**, pour avoir partagé ton expérience sur les techniques de ChIP et CoIP, pour ta présence lors du démarrage du projet Pifi ainsi que pour ton assistance précieuse au micromanipulateur.*

*Merci à **Yves, Stéphane, et Christophe**, ancien et nouveaux voisins de paillasse, pour votre aide face aux diverses questions et interrogations auxquelles j'ai pu être confrontée.*

*Un grand merci à **Julien** pour ton aide précieuse à la manipulation de la radioactivité durant les derniers mois, pour ta discrétion, et ta présence lors de mes moments de doute et coups de gueule.*

*Merci à **Laurent** avec qui j'ai débuté et terminé tant bien que mal ce doctorat ainsi qu'à **Vassoune** pour son aide lors de mon arrivée dans l'équipe, pour ses tuyaux judicieux et pour les nombreuses histoires qu'il avait à partager chaque jour.*

*Merci à **Fred**, alias Zorro, pour tes "bonjours" détonnants à l'heure où l'on dort encore, et pour toujours avoir le mot qu'il faut pour détendre l'atmosphère.*

*Sans oublier **Morgan** et **Julio**, voisins de bureau bruyants mais très patients, bon courage pour la fin de votre thèse.*

Merci aux postdoc passés et présents,

A virginie, pour sa présence, sa joie de vivre ainsi que les nombreuses discussions pas toujours scientifiques que nous avons pu partager lors des repas ou à la paillasse,

A Basheer pour sa bonne humeur quotidienne, sa grande aide lors de mon arrivée dans l'équipe, sa faculté à répondre à mes questions par des questions et tout simplement pour sa présence,

A Anne-Sophie pour sa gentillesse et ses conseils scientifiques précieux,

A Princesse Julie, pour son humour, sa joie de vivre, et pour toutes ces discussions partagées en pause café, pause bureau ou pause paillasse,

A Fez, pour son légendaire rôle signalant sa présence dans une pièce ainsi que pour son pessimisme à toutes épreuves.

A Dmitri, pour ses efforts de français face à la qualité de mon anglais.



Un grand Merci à Martine, pour les discussions quotidiennes à l'heure des repas, pour toutes tes petites attentions, pour nous faire partager tes talents culinaires, ainsi que pour ton efficacité à toute épreuve (sans même parler de l'autoclave!) qui nous permet de manipuler chaque jour.

Un grand Merci également à Isabelle, pour ta disponibilité et ton écoute, tu es comme une seconde mère pour nous à l'IGC...



Merci à tous les membres de l'IGC que je n'ai pas cité. J'ai été heureuse d'avoir pu côtoyer chacun d'entre vous et d'avoir partagé ces discussions scientifiques ou non autour d'un café ou entre deux portes de couloir.

Je souhaite également remercier le ministère de la recherche pour le financement de ma thèse ainsi que les donateurs de la Fondation pour la Recherche Médicale qui ont financé ma 4ème année.

Pour terminer par des remerciements plus personnels...

*Un grand merci à mes Parents **Soraya & Bruno** pour m'avoir permis d'arriver là où j'en suis, pour avoir supporté mes sautes d'humeur pendant toutes ces années et m'avoir toujours encouragé à continuer.*

*Un grand merci à **Eric**, pour sa présence, pour ses encouragements en particulier ces derniers mois lorsque les doutes à la finalisation de cette thèse ont été plus que présents. Merci pour ta patience et Merci pour ce cadeau qui nous attend très prochainement...*

*Merci à ma Soeur, **Sandra** et à ses deux Amours **Léa & Killian** grâce à qui je m'évade des soucis du quotidien...*

*Une pensée particulière pour mon grand-père **André** et ma grand-mère **Georgette**, qui ont toujours porté un grand intérêt à l'aboutissement de mes études et de cette thèse et qui n'ont malheureusement pas eu le temps d'y assister jusqu'à la fin...*

Sommaire

<u>ABRÉVIATIONS UTILISÉES</u>	<u>13</u>
<u>RÉSUMÉ</u>	<u>15</u>

1ere PARTIE: Recrutement de l'hélicase Pif1 par la protéine de réplication RPA
durant la réplication et aux cassures double-brins de l'ADN. 19

CHAPITRE1: INTRODUCTION

I DÉCOUVERTE DES TÉLOMÈRES ET DE LA TÉLOMÉRASE

II LA STRUCTURE DES TÉLOMÈRES

1. Les séquences télomériques..... 24

2. Description et conservation de la structure des télomères..... 24

2.1. Les télomères chez l'Homme 27

2.2. Les télomères chez *Schizosaccharomyces pombe* 30

III. LES TÉLOMÈRES CHEZ *S. CEREVISIAE*

1. Organisation de l'ADN télomérique 32

2. Les structures nucléoprotéiques..... 33

2.1. La protéine Rap1 34

2.2. Le complexe SIR..... 35

2.3. Le complexe Rif..... 36

2.4. Le complexe CST 36

2.5. L'hétérodimère KU..... 37

3. Réplication des extrémités et résection des télomères..... 37

4. L'élongation des télomères par la télomérase 40

4.1. La télomérase 40

4.2. Recrutement de la télomérase aux télomères 43

4.3. La reconnaissance préférentielle du télomère court..... 44

4.4. RPA facilite l'activité de la télomérase aux télomères 46

4.5. L'élongation et la processivité de la télomérase..... 46

4.6. La synthèse du brin complémentaire 47

4.7. Balance entre résection/recrutement de la télomérase/Synthèse du brin
complémentaire 48

IV. L'HÉLICASE PIF1.....

1. Rôle de l'hélicase Pif1 dans la réplication 51

1.1. Pif1 participe à la synthèse des fragments d'Okazaki 51

1.2. Pif1 participe à la résolution des structures G-Quadruplexes 53

2. Rôle de Pif1 dans la régulation de la télomérase	56
2.1. Pif1 limite la processivité de la télomérase aux télomères	57
2.2. Pif1 inhibe le recrutement de la télomérase aux cassures double-brins de l'ADN	58
2.3 Phosphorylation de Pif1 et signification fonctionnelle	59
3. La télomérase "Gain de fonction"	60
3.1. Présentation de la mutation <i>est2-up34</i> gain de fonction	60
3.2. Interaction génétique entre les protéines Pif1 et <i>Est2-up34</i>	61
3.3 Interaction physique entre Pif1 et l'ARN <i>TLC1</i> de la télomérase <i>Est2-up34</i>	62
<u>OBJECTIF DE L'ÉTUDE</u>	<u>65</u>
<u>CHAPITRE 2: RÉSULTATS</u>	<u>67</u>
<u>I. MISE EN ÉVIDENCE D'UNE INTERACTION ENTRE L'HÉLICASE PIF1 ET LA PROTÉINE DE RÉPLICATION RPA.....</u>	<u>68</u>
1. L'interaction Pif1/RPA	68
2. L'interaction Pif1/RPA dans les mutants <i>rfa1-D228Y</i> et <i>rfa1-t11</i>	70
3. L'interaction Pif1/RPA n'est pas nécessaire à la phosphorylation de Pif1 par Mec1 après induction de dommage à l'ADN.	73
<u>II L'INTERACTION PIF1/RPA EST IMPLIQUÉE DANS LE RECRUTEMENT DE PIF1 SUR UNE CASSURE DOUBLE BRIN DE L'ADN.....</u>	<u>74</u>
1. Le recrutement de Pif1 à une cassure HO est affecté dans le mutant <i>rfa1-D228Y</i>	74
2. Le recrutement de Pif1 est augmenté en contexte télomérase "up" indépendamment de la mutation <i>rfa1-D228Y</i>	75
3. Pif1 interagit avec l'ARN de la télomérase "gain de fonction"	77
4. La phosphorylation de Pif1 après induction de dommages à l'ADN n'est pas modifiée en contexte "télomérase up"	79
<u>III. L'INTERACTION PIF1/RPA AUX TÉLOMÈRES</u>	<u>81</u>
<u>IV. RÔLE DE L'INTERACTION PIF1/RPA DANS L'INSTABILITÉ DU MINISATELLITE CEB1</u>	<u>82</u>
<u>CHAPITRE 3: CONCLUSION, DISCUSSION.....</u>	<u>89</u>
I. Une interaction Pif1/RPA impliquée dans le recrutement de Pif1 sur une CDB.....	90
II. Rôle de l'interaction Pif1/RPA aux télomères.	93
III. Rôle de l'interaction Pif1/RPA dans la réplication du brin avancé du minisatellite CEB1.	94

2EME PARTIE: RÔLE DE L'HISTONE MÉTHYL TRANSFÉRISE SET1 DANS LA RÉGULATION DE LA TAILLE DES TÉLOMÈRES..... 95

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 97

I. ORGANISATION DE LA CHROMATINE 98

1. Structure de la chromatine 98
2. Les modifications covalentes des histones 99
 - 2.1. L'acétylation des histones 100
 - 2.2. Méthylation des histones..... 104
 - 2.3. Phosphorylation des histones 108
 - 2.4. Ubiquitination des histones..... 109
 - 2.5. Sumoylation des histon(Jenuwein et Allis 2001)es 109
3. Le code histone et la signification fonctionnelle des marques 110

II. LA MÉTHYLATION DE H3K4 ET LE COMPLEXE SET1 CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*..... 112

1. Organisation et assemblage du COMPASS..... 112
2. Distribution de la méthylation de H3K4 le long des gènes 115
3. Rôle des sous-unités du COMPASS dans la régulation de la méthylation 115

III. RÔLE DE LA MÉTHYLATION DE H3K4 118

1. Rôle de la méthylation de H3K4 dans la régulation de la transcription 118
2. Rôle de Set1 dans la méiose 121
3. Rôle de la méthylation de H3K4 dans la réparation des dommages à l'ADN..... 122
4. L'effet de position au télomère et la régulation de la taille des télomères..... 123

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE..... 125

CHAPITRE 2: RÉSULTATS 127

I. SET1 ET LA RÉGULATION DE LA TAILLE DES TÉLOMÈRES..... 128

1. Rôle des différentes formes de méthylation de H3K4 dans la régulation de la taille des télomères..... 128
2. Implication d'un mécanisme indépendant de la méthylation de H3K4 dans la régulation de la taille des télomères..... 130
3. Le raccourcissement des télomères n'est pas lié à la perte du TPE du mutant *set1* □ ... 132
4. La délétion de *SET1* aggrave le raccourcissement des télomères des mutants impliqués dans la régulation positive des télomères. 133
5. La délétion de *SET1* aggrave le rallongement des télomères des mutants impliqués dans la régulation négative des télomères..... 136

6. Le raccourcissement des télomères du mutant <i>set1</i> Δ ne semble pas lié à la voie de régulation des télomères par TERRA.....	141
<u>III. EFFET DU CIBLAGE DE SET1 AU TÉLOMÈRE</u>	<u>142</u>
<u>III. RÔLE DE SET1 SUR L'ADAPATION DES CELLULES ET LA RÉSECTION DES EXTRÉMITÉS D'ADN APRÈS INDUCTION D'UNE CDB NON RÉPARABLE.</u>	<u>146</u>
1. Set1 et l'adaptation.....	146
2. Set1 et la résection 5'-3' aux cassures de l'ADN.....	149
<u>CHAPITRE 3: CONCLUSION, DISCUSSION</u>	<u>151</u>
1. Implication partielle de la méthylation de H3K4 dans la régulation de la taille des télomères des cellules <i>set1</i> Δ	152
2. La perte de TPE n'est pas à l'origine du raccourcissement des télomères des cellules <i>set1</i> Δ	153
3. La voie de régulation de la taille des télomères par TERRA est indépendante de celle de Set1	153
4. Set1: deux activités antagonistes sur la régulation de la taille des télomères?.....	153
5. Effet du ciblage de Set1 aux télomères.	155
6. Rôle de Set1 sur l'adaptation des cellules et la résection des extrémités d'ADN après induction d'une CDB non réparable.	155
<u>MATÉRIELS & MÉTHODES.....</u>	<u>157</u>
1. Souches de levures et milieux de culture.....	158
2. Méthode de modification du génotype	158
3. Extraction de l'ADN génomique	159
4. Mesure de la longueur des télomère par Southern Blot.....	159
5. Extraction protéiques et Western blot.	160
6. Méthode de CoImmunoPrécipitation Pif1-myc/RPA.....	161
7. Analyse de la phosphorylation de Pif1	162
8. Méthode de CoImmunoPrécipitation Pif1-myc/TLC1 et analyse ARN.....	163
9. Méthode d'ImmunoPrécipitation de la Chromatine associée à Pif1myc après induction de cassure HO.....	163
10. Analyse par Southern Blot des cassures HO induites.....	164
11. Mesure de l'instabilité du minisatellite CEB1	165
12. Mesure de la résection	165
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>169</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>189</u>

Abréviations utilisées

Aalanine
ADNAcide DeoxyriboNucléique
ARNAcide Ribonucléique
ATMAtaxia Telangesia mutated
ATPadenosine TriPhosphate
ATRATM and Rad3-related
BLMhelicase mutated in Bloom syndrome
BRCTBRCA1 C-terminus
BrdUBromodésoxy-Uridine
Ccytosine
CDBCassure double-brins
Cdc28Cell Division Cycle 28
Cdk1Cycline Dependent Kinase 1
ChIPChromatin ImmunoPrecipitation
CoIPCoImmunoPrecipitation
COMPASSComplex of proteins associated with Set1
CSTComplexe Cdc31-Stn1-Ten1
dbdouble brin
DBDDNA Binding Domain
ESTEver Shorter Telomeres
FANCIhelicase mutated in Fanconi Anemia DNA
FEN-1Flap ENdonuclease 1
FLPFLiPase
FoAFluoroorotique Acid
FRTFLP Recombinase Target
GGuanine
GCRGross chromosomal Rearrangement
HHistone
HATHistone Acétyl Transférase
HDACHistone Deacétylase

HMTHistone Methyl Transférase
HRHomologous Recombination
Klysine
KMT lysine Methyltransférase
MRXMre11-Rad50-Xrs2
NADNicotinamide Adenine Dinucléotide
NHEJNon Homologous End Joining
ntnucléotide
pbpaire de base
Pif1Petite Integration Frequency 1
POT1Protection of Telomere 1
PRMTProtein arginine Methyltransferase
QGlutamine
R Arginine
Rap1Repressor activator protein 1
RCTRap1 C-terminal
rDNAADN ribosomal
RifRAP1-Interacting Factor
RPAReplication Protein A
RTReverse Transcription
Sserine
sbsimple-brin
SIRSilent Information Regulator
SETSu(var)3-9, Enhancer of zeste, Trithorax
Tel1TELomere maintenance 1
TThymidine
TIN2TRF1-interacting nuclear protein 2
TPP1TIN2 and POT1 interacting protein
TPETelomeric Position Effect
TRBDTelomeric RNA-Binding Domain
TRFTelomeric Repeat-binding Factors
UVUltra Violet
WRNhelicase mutated in Werner syndrome

Résumé

Différents rôles de l'hélicase Pif1 ont été décrits dont le plus documenté est de décrocher la télomérase des télomères en déroulant les hybrides ARN/ADN formés entre l'ARN de la télomérase et l'ADN télomérique. Plus récemment, une nouvelle voie de signalisation des dommages à l'ADN a été mise en évidence, qui inhibe l'action de la télomérase au niveau d'une cassure de l'ADN *via* la phosphorylation de l'hélicase Pif1. Cette phosphorylation, dépendante de la kinase ATR (Mec1), inhibe la réparation aberrante de la cassure d'ADN par la télomérase. Nous étudions au sein de l'équipe la protéine RPA (Replication Protein A), affine de l'ADN simple-brin, qui recrute à la fois la protéine de recombinaison homologue Rad52 et la protéine Mec1 impliquée dans la cascade de signalisation des dommages de l'ADN. Lors de l'étude de différentes fonctions de l'hélicase Pif1, j'ai mis en évidence une interaction robuste entre Pif1 et RPA. J'ai identifié un allèle de *RFA1*, *rfa1-D228Y*, affectant l'interaction Pif1/RPA et montré, grâce à cet allèle, que cette interaction est impliquée dans le recrutement de Pif1 au niveau d'une cassure double-brins (CDB) induite de l'ADN. Enfin, il a été récemment mis en évidence un nouveau rôle de Pif1 dans la stabilité des G-Quadruplexes durant la réplication du brin avancé. En effet, les cellules *pif1Δ* présentent un taux d'instabilité du minisatellite CEB1 inséré sur le brin avancé d'environ 56%, correspondant à des réarrangements de l'ADN de type contractions ou expansions. Lors de l'étude de l'interaction Pif1/RPA, j'ai montré que la mutation *rfa1-D228Y* entraîne une instabilité du minisatellite CEB1 présent sur le brin avancé, similaire à celle observée avec la délétion *pif1Δ*. Nous suggérons un modèle selon lequel RPA recruterait Pif1 au cours de différents processus cellulaires tels que la réponse des dommages à l'ADN ou la réplication des structures particulières de l'ADN telles que les G-Quadruplexes.

En parallèle de cette étude, j'ai étudié le rôle de l'histone méthyltransférase Set1 spécifique de la lysine 4 de l'histone H3 dans la régulation de la taille des télomères. J'ai mis en évidence que le raccourcissement des télomères observé dans un mutant *set1Δ* est lié à l'absence de di- et tri-méthylation de H3K4 alors que la perte de monométhylation n'a aucun effet. Cependant, le défaut de la taille des télomères dans les cellules *set1Δ* n'est pas uniquement lié au défaut de méthylation de H3K4 mais semble impliquer une autre activité de Set1 qu'il reste à déterminer. Étonnamment, nous avons observé que la délétion de *SET1* aggrave le raccourcissement des télomères des mutants dont les gènes sont impliqués dans la régulation positive de la taille des télomères et inversement, aggrave le rallongement des télomères de mutants dont les gènes sont impliqués dans la régulation négative des télomères. Nous postulons que l'inactivation de Set1 pourrait à la fois inhiber l'activation précoce des origines de réplication des régions subtélomériques et conduire à un sur-raccourcissement de la taille des télomères, à la fois affecter la synthèse du brin complémentaire dans un contexte où celle-ci est affectée (mutant *rif1Δ*) et conduire à un sur-allongement des télomères. Une seconde hypothèse propose que Set1 régulerait la transcription de TERRA dans des cellules ayant les télomères déprotégés (mutant *rif*) entraînant le sur-allongement des télomères.

Abstract

Different roles of Pif1 helicase have been described, the best documented being to remove telomerase from telomeres by unwinding the RNA/DNA hybrid between telomerase RNA and telomeric DNA. Recently, it was shown that the DNA damage signaling down-regulates telomerase action at a DNA break *via* Pif1 phosphorylation. Pif1 phosphorylation is dependent of the checkpoint kinase ATR (Mec1) and prevents the aberrant healing of broken DNA ends by telomerase. In our laboratory, we study RPA (Replication Protein A), a single-strand DNA binding protein which recruits the proteins involved in the DNA damage response and checkpoint regulation, such as the homologous recombination protein Rad52 and Mec1 involved in the DNA damage response. I have identified an allele of RFA1, *rfa1-D228Y*, that affects the Pif1/RPA interaction and showed using this allele that this interaction is implicated in the Pif1 recruitment at an induced double-strand break. Recently, a new role of Pif1 in the stability of G-quadruplex DNA during the leading strand replication has been described. *pif1Δ* cells show an instability about 56% of the human minisatellite CEB1 inserted on the leading strand. During my study of the Pif1/RPA interaction, I showed that the *rfa1-D228Y* mutant induced a similar instability of CEB1 minisatellite on the leading strand. We suggested that RPA would recruit Pif1 for many cellular processes such as DNA damage response or replication of secondary DNA structures such as G-Quadruplexes.

In parallel, I have studied the role of the Set1 Histone methyltransferase which catalyse the methylation of the lysine 4 of histone H3, in the regulation of telomere length. I showed that the telomere shortening observed in *set1Δ* mutant is due to the loss of di- and tri-methylation of H3K4 while the loss of monomethylation has no effect. However, the short telomeres in *set1Δ* cells is not only due to the methylation defect shedding light on a new Set1 activity that remains to be fully characterized.. The *SET1* deletion aggravates the telomere shortening of mutants which genes are involved in positive regulation of telomere length and conversely, aggravates the lengthening of mutants which genes are involved in negative regulation of telomere length. We postulated that inactivation of Set1 could affect at once activation of early-replication origins and leads to a telomere shortening, and affect synthesis of complementary strand in a context where this one is affected (mutant *rif1Δ*) and leads to a telomere lengthening. A second hypothesis propose that Set1 would regulate TERRA transcription in cells with deprotected-telomere (*rif* mutant) leading to the lengthening of telomeres.

1ere PARTIE:

*Recrutement de l'hélicase Pif1 par la
protéine de réplication RPA durant la
réplication et aux cassures double-
brins de l'ADN.*

Chapitre 1:

Introduction

I Découverte des télomères et de la télomérase

Les études du généticien H.J. Muller sur les chromosomes de *Drosophile* ont donné naissance au concept de télomère (du grec *telos* (fin) et *mere* (segment)). En 1938, Muller avait observé qu'à la suite d'une irradiation, les chromosomes cassés fusionnaient entre eux, alors que les extrémités des chromosomes restaient intactes. Il avait déduit que des structures particulières présentes aux extrémités des chromosomes mais absentes aux extrémités issues de cassures de l'ADN protégeaient l'extrémité des chromosomes (Muller, 1938). Il a appelé ces structures les télomères. Les télomères, sont constitués de complexes nucléoprotéiques dont le rôle essentiel est de protéger les chromosomes de la dégradation par des exonucléases, des événements de recombinaison et des fusions (Zakian 1995). L'intégrité de leur fonction est également nécessaire à l'architecture nucléaire, à la bonne ségrégation des chromosomes dans les cellules filles, et à la réplication complète des chromosomes.

Le Prix Nobel de médecine 2009, attribué à Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider, qui était son étudiante dans les années 1980, et Jack W. Szostak, récompense le rôle déterminant de ces chercheurs dans la compréhension des télomères et la découverte de la télomérase. A la fin des années 70, E. Blackburn et Joseph Gall identifiaient chez un protozoaire cilié, très commun en eau douce, appelé *Tetrahymena thermophila*, des fragments extrachromosomiques d'ADN de petite taille, codant pour des ARNs essentiels à la biosynthèse du ribosome. De façon remarquable, les extrémités de ces formes extrachromosomiques d'ADN, qui se maintenaient de façon stable, contenaient à leur extrémité des séquences répétées de 20 à 70 fois dont la séquence était TTGGGG. En parallèle de ces études, J. Szostak et Rodney Rothstein s'intéressaient à la transformation de fragments linéaires d'ADN chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ces fragments d'ADN introduits artificiellement dans la levure s'intégraient dans le génome de la levure au niveau de séquences homologues ou étaient invariablement dégradés selon un processus qui rappelait l'observation de H.J. Muller et B. McClintock concernant l'instabilité des chromosomes cassés.

Il se posa alors la question concernant la stabilité des fragments linéaires. En effet, les fragments linéaires extrachromosomiques de *Tetrahymena thermophila* étaient stables, alors que les fragments linéaires d'ADN non insérés dans le génome de la levure étaient instables. En se basant sur leurs travaux respectifs, E. Blackburn et J. Szostak ont émis l'hypothèse que les séquences terminales TTGGGG pouvaient stabiliser les fragments linéaires d'ADN

introduits dans la levure. Ils collaborèrent pour construire un plasmide linéaire de levure dont les extrémités étaient constituées par des séquences répétées de type TTGGGG. Leur prédiction se révéla exacte puisque les plasmides linéaires étaient à présent stabilisés. L'autre observation remarquable était que des nouvelles séquences de type TGGG étaient ajoutées à l'extrémité du plasmide linéaire introduit dans la levure. Ces séquences avaient été ajoutées par une activité enzymatique de la levure responsable de la synthèse *de novo* de télomères. Contrairement aux ADN polymérases, cette nouvelle activité n'utilisait pas une matrice d'ADN pour ajouter des nucléotides à l'extrémité du chromosome.

Il restait à identifier cette nouvelle activité capable de synthétiser des télomères et qui pouvait enfin apporter la solution au fameux « *End-replication problem* » de J. Watson. E. Blackburn et C. Greider cherchèrent à purifier cette activité à partir d'extraits de *Tetrahymena thermophila* qui subit au cours de son cycle végétatif une fragmentation massive de ses chromosomes. Leur idée était que cette nouvelle activité devait être abondante chez ce protozoaire cilié car chaque fragment d'ADN se retrouvait coiffé d'un télomère. Grâce au développement d'un test d'activité *in vitro* basé sur l'extension d'une amorce TTGGG, elles identifièrent la télomérase, l'enzyme responsable de la synthèse des télomères. Elles démontrèrent que la télomérase comprend une partie protéique et une partie ARN qui sert de matrice pour polymériser les nucléotides à l'extrémité 3' de l'extrémité des chromosomes. Elles réalisèrent que la télomérase était une reverse-transcriptase spécialisée (une enzyme capable de copier de l'ARN en ADN).

Par la suite, J. Szostak et Vicky Lundblad imaginèrent un crible génétique, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, destiné à identifier des gènes dont l'activité est nécessaire à l'action de la télomérase *in vivo*. Ils identifièrent les gènes de la télomérase et de ses sous-unités et firent l'observation fondamentale que l'inactivation de la télomérase produit un raccourcissement de l'extrémité des chromosomes à l'occasion des divisions cellulaires successives (phénotype EST pour ever-short telomere). De là est née l'idée de l'existence d'un « sablier mitotique » limitant les divisions cellulaires. Le principe de ce sablier mitotique réside dans l'érosion progressive des télomères survenant à chaque division cellulaire dans des cellules dépourvues d'activité télomérase. Au dessous d'une certaine taille, un ou plusieurs télomères émettent un signal qui déclenche l'arrêt des divisions cellulaires, un processus que l'on appelle la sénescence réplivative (Géli, Inserm actualité 2009).

Il est maintenant bien établi que la télomérase agit à la fois comme un acteur clé de l'oncogénèse et comme un suppresseur de tumeurs. D'une part, l'absence de télomérase dans

les tissus somatiques peut conduire à des télomères dysfonctionnels et favoriser l'instabilité génétique liée aux étapes précoces du cancer. D'autre part, l'activation de la télomérase dans les cellules cancéreuses est requise pour permettre la croissance à long terme des cellules transformées. Outre la télomérase, de nombreux facteurs contrôlent la structure et la fonction des télomères suggérant qu'ils puissent aussi agir comme des suppresseurs de tumeurs.

II La structure des télomères

1. Les séquences télomériques

Chez toutes les espèces étudiées, l'ADN télomérique est formé de courtes répétitions en tandem dont l'un des brins est riche en Guanine et se prolonge par une extrémité 3' simple-brin. Les différentes espèces étudiées ont montré que la séquence télomérique était formée par la répétition en tandem de courts motifs d'ADN de 6 à 8 pb et dont l'un des brins est riche en guanine (G) (Tableau 1). La séquence de l'ADN télomérique reflète la séquence de la matrice de l'ARN associé à la télomérase.

Tableau 1 La structure primaire des télomères chez différentes espèces telles que les protozoaires, les champignons, les plantes ou encore les vertébrés, est formée de répétitions en tandem riches en T et en G de taille variant de 6 à 8 nt (LeBel et Wellinger 2004)

Organismes	Séquences répétées	Abréviation des répétitions
Protozoaires		
<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG	T ₂ G ₄
<i>Oxytricha</i>	TTTTGGGG	T ₄ G ₄
<i>Euplotes</i>	TTTTGGGG	T ₄ G ₄
<i>Trypanosome</i>	TTAGGG	T ₂ AG ₃
Champignons		
<i>Saccharomyces</i>	TGTGGTGTGGG	(TG) ₁₋₆ TG ₂₋₃
Plantes		
<i>Arabidopsis</i>	TTTAGGG	T ₃ AG ₃
<i>Silene</i>	TTTAGGG	T ₃ AG ₃
Vertébrés		
<i>Homo sapiens</i>	TTAGGG	T ₂ AG ₃

2. Description et conservation de la structure des télomères

Grâce aux études menées chez divers organismes, notamment *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* et chez l'homme, une conservation de la structure des

télomères à travers l'évolution a été mise en évidence. Des complexes nucléoprotéiques spécifiques des télomères jouent un rôle de protection contre les évènements de fusion et recombinaison. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'ADN télomérique est recouvert par la protéine Rap1 qui interagit soit avec le complexe SIR responsable de l'hétérochromatine subtélomérique, soit avec les protéines Rif1 et Rif2 qui régulent négativement l'élongation des télomères. L'extension simple-brin est quant à elle recouverte par la protéine Cdc13 qui forme un hétérotrimère avec les protéines Stn1 et Ten1 (*Figure 1A*). De nombreuses études ont permis de décrire les orthologues structuraux de Rap1 chez de nombreuses espèces, notamment chez *S. castellii*, *C. glabrata*, *K. lactis*, *C. albicans*, *S. pombe* et chez l'homme (Haw et al. 2001) (Kano et Ishikawa 2001) (Larson et al. 1994); (Li et al.2000); (Uemura et al. 2004) (*Figure 2*). Chez *Schizosaccharomyces pombe*, l'orthologue fonctionnel de Rap1 est Taz1. La protéine Rap1 a conservé ses fonctions dans la régulation de la longueur des télomères, l'effet de position au télomère (TPE pour "Telomere Position Effect") et l'inhibition des évènements de fusion télomérique, mais son domaine Myb de liaison à l'ADN n'est que partiellement conservé. Son interaction avec l'ADN télomérique est médiée par la protéine Taz1 qui se présente comme l'orthologue de Rap1 (Kano et Ishikawa 2001). Chez *S. pombe*, le complexe télomérique est formé de Taz1, Rap1, Poz1 qui se lient à l'ADN duplex alors que Tpz1, Ccq1 sont liés à l'ADN simple-brin par Pot1 (*Figure 1B*). La protéine Pot1 (protection of telomere 1) a été identifiée chez l'homme et chez *S. pombe* par homologie avec les protéines Cdc13 (*S. cerevisiae*) et TEBP (*Oxytrichia nova*) et fixe sélectivement les répétitions simple-brin télomériques grâce à un domaine OB (Oxytrichia DNA binding) (Baumann et Cech 2001). L'interaction entre Poz1 et Tpz1 établit un lien entre l'ADN double-brins sur lequel se fixe Taz1 et l'ADN simple-brin fixant Pot1. Un modèle d'évolution des télomères entre les espèces de levure est présenté en Figure 2. Chez les mammifères, un complexe, appelé "shelterin" est composé de 6 protéines, TRF1, TRF2, RAP1, Tin2, TPP1 et Pot1 (*Figure 1C*). TRF1 et TRF2 se fixent à l'ADN télomérique double-brins et sont reliés par TIN2. De façon similaire à la situation décrite chez *S. pombe*, TPP1 en se fixant à POT1 établit un lien entre l'ADN double-brins et simple-brin.

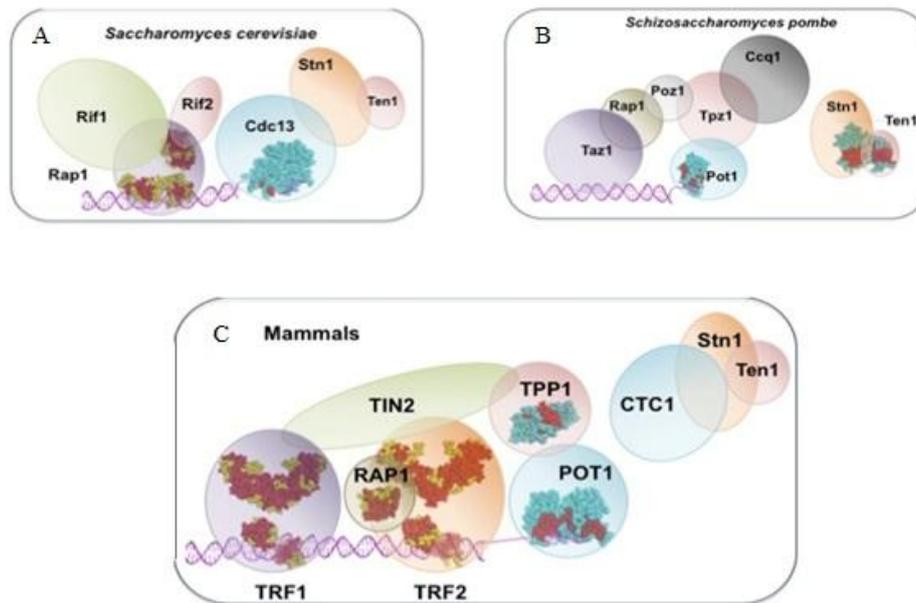


Figure 1 Structure schématique des protéines télomériques (A) chez *S. cerevisiae*, (B) *S. pombe* et (C) chez les mammifères. Les structures connues des protéines et les différents domaines sont représentés. Les structures secondaires telles que les hélices α de TRF1, TRF2, RAP1 et ScRap1 et les feuillettes β de POT1, spPot1, TPP1, Cdc13, TEBP, Stn1 et Ten1 sont représentés en rouge (Giraud-Panis et al. 2010)

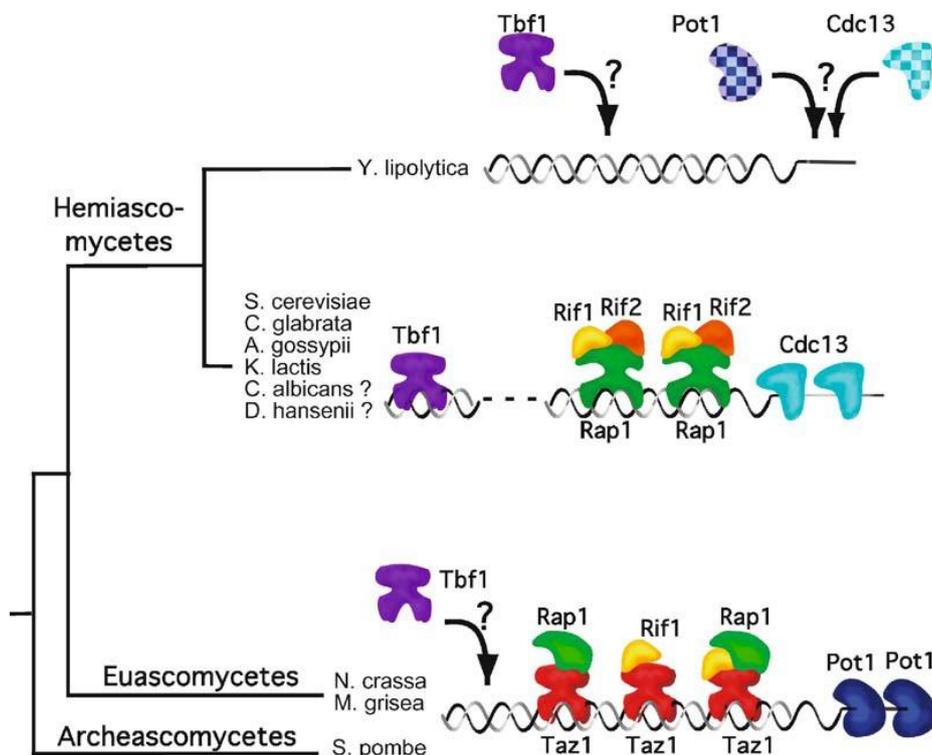


Figure 2 Modèle d'évolution des télomères à travers les espèces Les télomères de la famille des Archeascomycètes comprenant *S. pombe* sont recouverts par la protéine Taz1 qui lie l'ADN double-brins et la protéine Pot1 qui lie l'ADN simple-brin. La famille des Euascomycètes divergeant de *S. pombe* possède probablement des complexes télomériques de type Taz1/Pot1. Chez les Hemiascomycètes comprenant *S. cerevisiae*, de nouvelles protéines telles que Rap1 et Cdc13 sont recrutées au télomère (Teixeira et Gilson 2005).

2.1. Les télomères chez l'Homme

- Structure du télomère chez l'homme

Chez les Eucaryotes supérieurs, les télomères peuvent former des structures particulières appelées Telomere-loop ou "T-loop" qui leurs assurent une protection supplémentaire (O'Sullivan et Karlseder 2010); (Denchi 2009). La T-loop est une structure en boucle qui correspond à l'invasion du duplexe télomérique par la brin G télomérique. Suite à cette invasion, il se forme une D-loop (Displacement loop) similaire à l'intermédiaire de recombinaison formé pendant la recombinaison homologe (Mohaghegh et al. 2001) (Opresko et al.2009). La formation de cette structure serait permise par une taille relativement longue du simple-brin télomérique. La stabilisation du télomère et la formation de la "T-loop" sont facilitées par le complexe shelterin. Comme nous l'avons mentionné, le complexe shelterin est formé de 6 protéines télomériques (Liu et al. 2004) (Palm et de Lange 2008). Deux d'entre elles, appelées "Telomeric Repeat-binding Factors" 1 et 2 (TRF1 et TRF2) se lient directement aux répétitions télomériques double-brins (Smith et de Lange 1997) (Bilaud et al. 1997). Pot1 se fixe à l'ADN télomérique simple-brin. La protéine TIN2 (TRF1-interacting nuclear protein 2) interagit avec les protéines TRF1 et TRF2 alors que la protéine TPP1(TIN2 and POT1-interacting protein) interagit avec les protéines TIN2 et POT1. Rap1 est recruté au télomère *via* son interaction avec la protéine TRF2 (*Figure 3*). La structure des télomères est détaillée dans le paragraphe suivant.

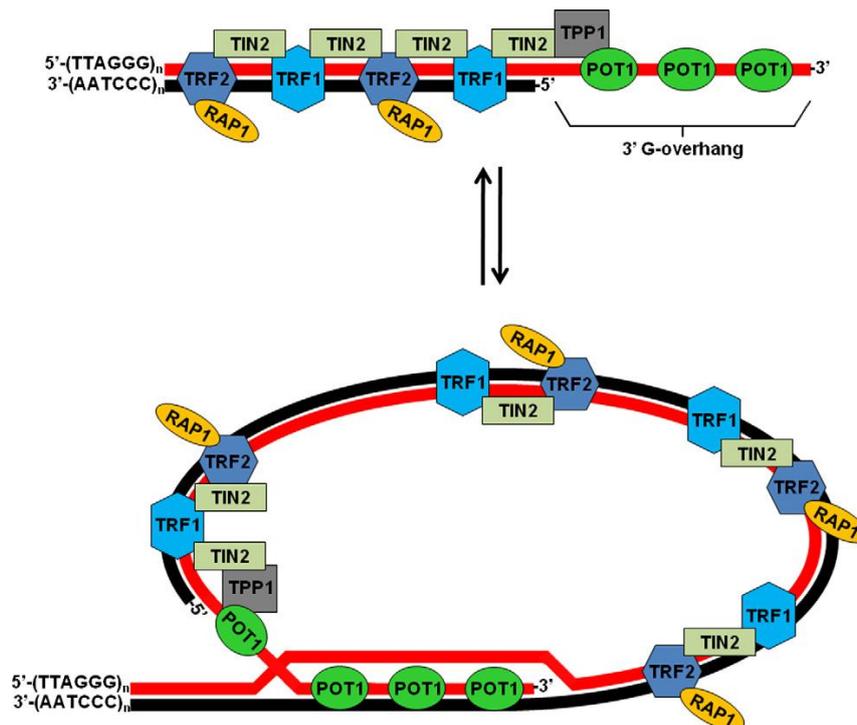


Figure 3 Structure du télomère humain. Les interactions spécifiques entre les composants du complexe shelterin avec les régions de l'ADN télomériques entraînent la formation d'une boucle par l'invasion du simple-brin télomérique terminal à l'intérieur de la séquence double-brins après repliement du télomère sur lui-même (Lamarche, Orazio, et Weitzman 2010).

- Rôle des protéines du shelterin

Les protéines du shelterin TRF1, TRF2 et POT1 modulent diverses activités telles que des activités nucléase, hélicase, polymérase, recombinaise et chaperonne qui contrôlent différents aspects de l'homéostasie des télomères (Gilson et Geli 2007). La protéine TRF2 interagit avec différentes enzymes pouvant contrôler la formation du brin G-riche, notamment XPF1/ERCC1, MRN, WRN/BLM et Apollo (Figure 4). Ces différentes activités peuvent rendre compte au moins partiellement, des événements suivant l'inactivation de TRF2 ou sa surexpression, menant à la perte de la queue G-riche simple-brin et à une perte rapide du télomère respectivement. TRF2 est également impliquée dans la formation de la T-loop, probablement par une activité chaperonne permettant l'invasion de l'ADN double-brins par le brin 3' sortant, par l'induction d'un stress topologique, par la fixation et la déstructuration des G-quadruplexes et par la déstabilisation de la D-loop *via* l'activité des hélicase RecQ, WRN et BLM (Amiard et al. 2007) (Stansel et al. 2001) (Fouché et al. 2006) (Griffith et al. 1999). Pot1 assisterait TRF2 dans ce processus en favorisant l'ouverture de la D-loop par les enzymes WRN et BLM (Opresko et al. 2005) également capables de défaire des structures G4 (Zaug et al. 2005).

TRF1 interagit avec différentes protéines modulant l'activité de la télomérase telle que Pot1. Ces interactions pourraient rendre compte du raccourcissement des télomères suivant la surexpression de TRF1. TRF1 peut également agir sur la dissociation de l'ADN télomérique double-brins suggérant un rôle de TRF1 dans la formation de la T-loop et l'association télomère/télomère au moment de l'interphase. Enfin TRF1 facilite la progression de la fourche de réplication à travers les séquences télomériques (Schoeftner et Blasco 2008).

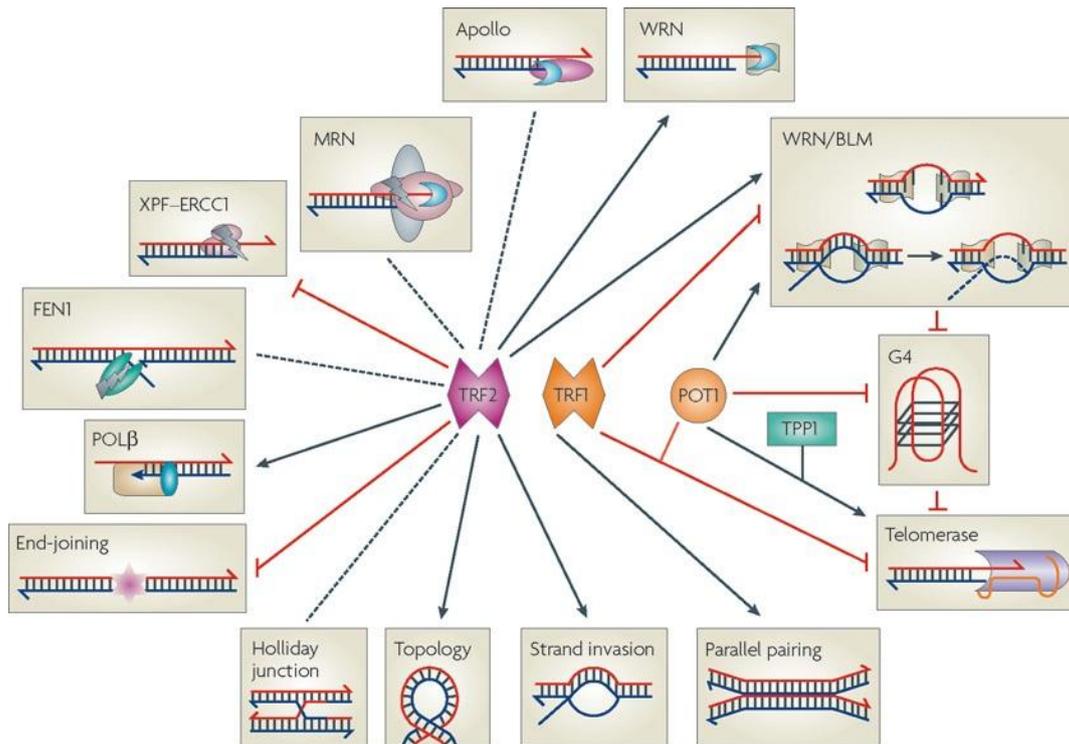


Figure 4 Activités enzymatiques et conformations de l'ADN contrôlées par les protéines télomériques humaines. Les protéines du shelterin recrutent différentes enzymes impliquées dans l'homéostasie des télomères. Les hélicases de la famille RecQ (BLM et WRN) recrutées par TRF2 et POT1 sont impliquées dans l'élimination de structures secondaires éventuelles comme les G-quadruplexes qui empêcheraient la progression de la fourche de réplication. TRF2 favoriserait l'ouverture de T-loop et POT1 qui stimule les capacités de BLM et WRN à dérouler l'ADN télomérique assure une connexion entre ces hélicases et la régulation des télomères (Gilson & G&li, 2007).

Chez l'homme, il existe un raccourcissement des chromosomes dans la plupart des cellules somatiques dépourvues d'activité télomérase au fil des années. L'ADN télomérique constitué de répétitions riches en T et en G étant non codant, sa perte à chaque division ne constitue pas un évènement délétère. Néanmoins, lorsque leur taille atteint une longueur critique conduisant à l'altération de leur intégrité, la cellule perçoit le télomère érodé comme une cassure double-brins. La signalisation de la cassure conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et

la cellule entre en sénescence (Lundblad et Szostak 1989). Dans les cellules exprimant des niveaux suffisants de télomérase, les télomères sont maintenus par un mécanisme spécifique impliquant la télomérase qui contient en son sein un ARN servant de matrice pour l'addition des répétitions télomériques (Shippen-Lentz et Blackburn 1990).

2.2. Les télomères chez *Schizosaccharomyces pombe*

- Structure du télomère de *S. pombe*

Chez *Schizosaccharomyces pombe*, les télomères ont été clonés et séquencés pour la première fois dans les années 80 par Sugawara et Szostak (Sugawara & Szostak, 1986), révélant une structure répétée de type (G₂₋₆TTAC[A]) d'environ 300 pb. Chez la levure *S. pombe*, une seule protéine lie le double brin télomérique; c'est l'homologue des protéines TRF1 et TRF2 : la protéine Taz1. Taz1 se lie directement à ces répétitions télomériques double-brins. Les protéines Rap1 et Rif1 se lient au complexe télomérique *via* une interaction avec la protéine Taz1. Des observations génétiques montrent qu'il existerait une compétition entre les protéines Rap1 et Rif1 pour leur interaction avec la protéine Taz1 (Kano et Ishikawa 2001). Par deux mécanismes indépendants, Rap1 et Rif1 régulent de façon négative l'activité de la télomérase au télomère (Kano et Ishikawa 2001). L'homologue fonctionnel (pour sa fonction de protection) de Cdc13, appelé Pot1 (pour Protection of Telomere 1) se fixe sur l'ADN télomérique simple-brin G-riche. Le groupe d'Ishikawa a identifié trois nouveaux partenaires du complexe télomérique par purification des facteurs associés à Pot1 (Miyoshi et al. 2008). La protéine Tpz1 se lie à l'ADN simple-brin (sb) *via* une interaction avec Pot1. La protéine Poz1 permet de relier le complexe Taz1/Rap1 fixé sur l'ADN db au complexe Pot1/Tpz1 fixé sur l'ADN sb. La protéine Ccq1 interagit avec Tpz1 et permet le recrutement de la télomérase. Finalement, un complexe Stn1/Ten1 se lie à l'ADN télomérique sb (*Figure 65*).

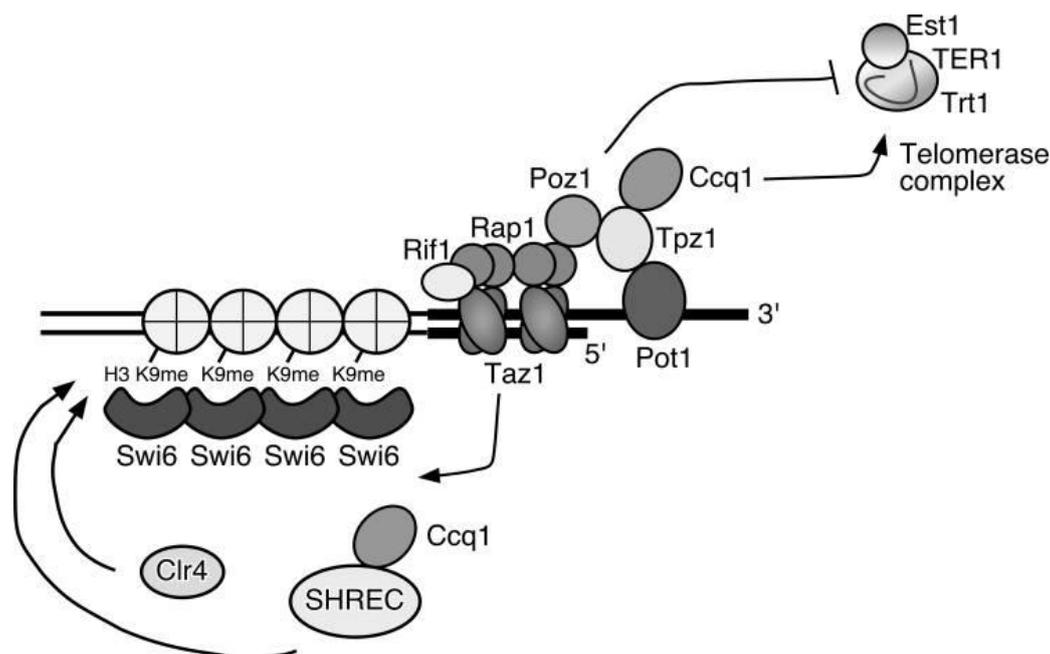


Figure 5 Structure du télomère chez *Schizosaccharomyces pombe*. Le complexe formé par les protéines *Taz1*, *Rap1*, *Poz1*, *Tpz1*, *Pot1* et *Ccq1* est similaire au complexe shelterin observé chez les mammifères. *Taz1*, *Rap1* et *Poz1* sont important pour la régulation négative de la télomérase alors que *Ccq1*, *Tpz1* et *Pot1* sont impliqués dans le recrutement de la télomérase aux télomères. *Ccq1* est également associé avec le complexe *SHERC* et favorise la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me) dépendante de *Clr4* et ainsi l'accumulation de *Swi6* au télomère (Khair et al., 2009).

- Fonction du télomère de *S. pombe*

Les protéines *Taz1* et *Pot1* coordinent les activités nécessaires à la protection des télomères. *Taz1* inhibe la télomérase (Cooper et al. 1997), favorise le passage de la fourche de réplication (Miller et al. 2006) et limite la résection télomérique dépendante du complexe MRN et de *Dna2* (Tomita et al. 2004). La perte de la protéine *Taz1* engendre également des altérations importantes conduisant à de nombreuses fusions télomériques par les mécanismes de NHEJ et recombinaison (Ferreira et Cooper 2004). *Pot1* est principalement impliquée dans la fonction de protection du télomère. La délétion de *POT1* entraîne la perte des répétitions télomériques sur plusieurs kb et la survie des cellules nécessite la recircularisation des chromosomes (Pitt et Cooper 2010). Le rôle de protection est également assuré par les protéines *Stn1* et *Ten1*. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité des télomères et, bien que n'interagissant pas directement avec *Pot1*, leur localisation au télomère corrèle avec la présence d'ADN simple-brin 3' sortant (Martín et al. 2007).

Les télomères longs présentent un grand nombre de complexes *Taz1/Rap1* favorisant les interactions avec le complexe *Pot1/Tpz1/Ccq1* via *Poz1*. Ces interactions entraînant une conformation "fermée" du télomère, inhibent le recrutement de la télomérase. Sur les

télomères courts, la concentration de complexes Taz1/Rap1 liés à la chromatine diminue, réduisant les interactions potentielles avec le complexe Pot1/Tpz1/Ccq1. Cette structure ouverte du télomère favorise le recrutement de la télomérase par la protéine Ccq1 (Figure 6).

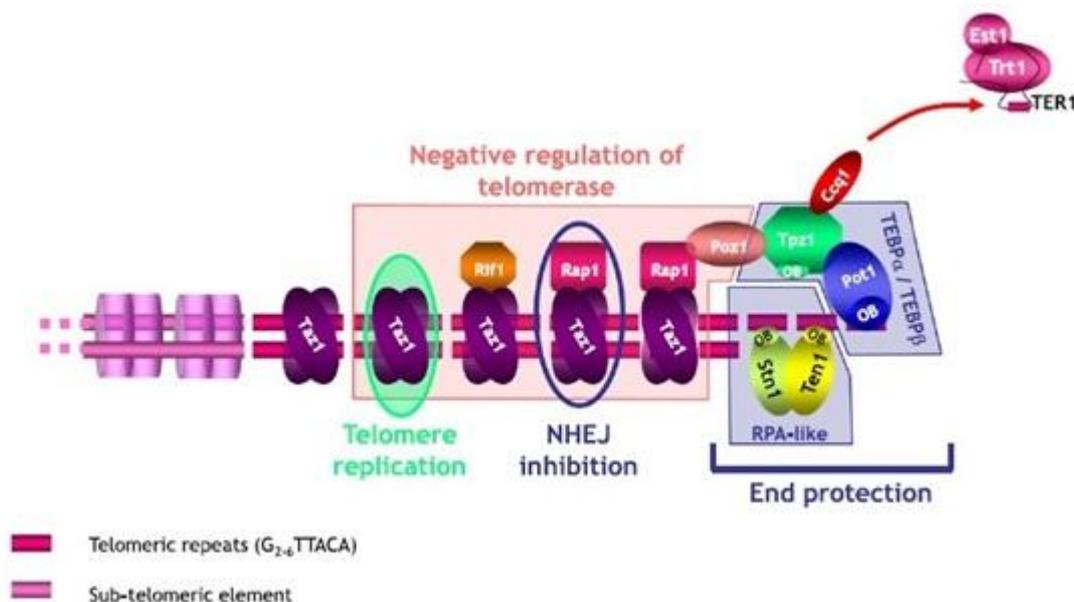


Figure 6 Les différentes fonctions assurées par le télomère chez *S. pombe*. (Dehé et Cooper 2010). Les différentes protéines présentes aux télomères assurent différentes fonctions impliquées dans le maintien de l'intégrité du télomère, telles que les fonctions de protection, d'inhibition des événements de fusion par NHEJ ou recombinaison et favorisent également le passage de la fourche de réplication.

III. Les télomères chez *S. cerevisiae*

1. Organisation de l'ADN télomérique

L'ADN télomérique est constitué de séquences répétées en tandem riche en G de type 5'(TG₁₋₃)₃' sur environ 300 paires de bases (Louis 1995) (Wellinger et Sen 1997). Le brin riche en G de l'ADN télomérique s'étend de 5' vers 3' en direction de l'extrémité du chromosome et se termine par une extrémité sortante simple-brin en 3' composée d'environ 12 à 15 nucléotides (Figure 7). En amont des répétitions télomériques, il existe deux types d'éléments répétés conservés, X et Y'. L'élément Y' est présent dans la moitié des régions subtélomériques de la levure. L'autre région, appelée core X de plus petite taille, est présente soit au début des régions subtélomériques sans Y', soit après les répétitions Y' (Louis et Haber 1990). Les télomères contenant à la fois les éléments X et Y' sont définis comme appartenant à la classe XY', et les télomères contenant seulement l'élément X appartiennent à la classe X.

Tous les chromosomes possèdent un core X de 475 pb. Les télomères XY' ont en plus un élément Y' présent entre une et quatre copies. Ces différents éléments sont séparés par des répétitions subtélomériques qui contiennent notamment des répétitions de type TG₁₋₃. Contrairement aux régions subtélomériques formées des éléments X et Y', les régions télomériques sont dépourvues de nucléosomes. L'ADN télomérique est donc protégé grâce à une structure particulière appelée télosome (Wright et al. 1992).

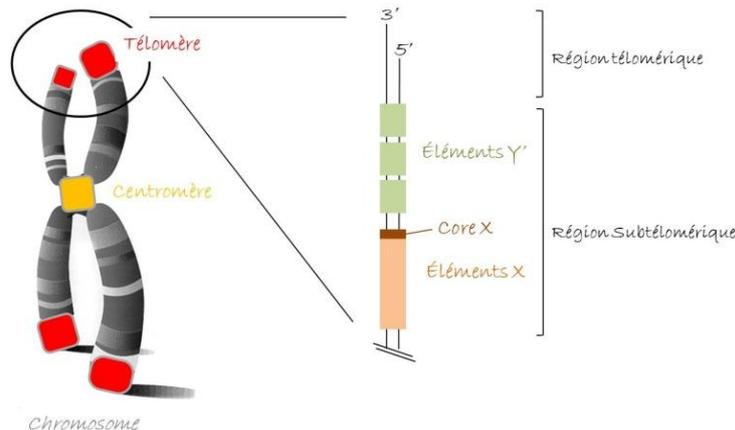


Figure 7 Organisation des régions télomériques et subtélomériques chez *S. cerevisiae*. A gauche: Représentation d'un chromosome avec les régions télomériques en rouge et le centromère en jaune. A droite: Organisation des régions subtélomériques avec l'élément X terminé par le core X conservé suivi des répétitions d'éléments Y'. Représentation du télomère avec son extrémité 3' simple-brin sortante.

2. Les structures nucléoprotéiques

Le "télosome" de *S. cerevisiae* est formé d'ADN télomérique complexé à des protéines télomériques spécifiques décrites ci-dessous (Figure 8). La protéine Rap1 (Repressor/activator protein 1) se lie à la partie double-brins télomérique tandis que la protéine Cdc13 (cell division cycle 13) qui forme un hétérotrimère avec les protéines Stn1 et Ten1, se lie aux répétitions TG₁₋₃ simple-brin de l'extrémité 3'. La protéine Rap1 interagit elle-même à la fois avec le complexe SIR (Silent Information Regulators) (Moretti et al. 1994) via une interaction directe avec Sir4 (à l'origine de la formation de l'hétérochromatine subtélomérique), ainsi qu'avec les protéines Rif1 et Rif2 (Rap1 Interacting Factor) (Hardy et al. 1992) qui contrôlent négativement l'élongation des télomères.

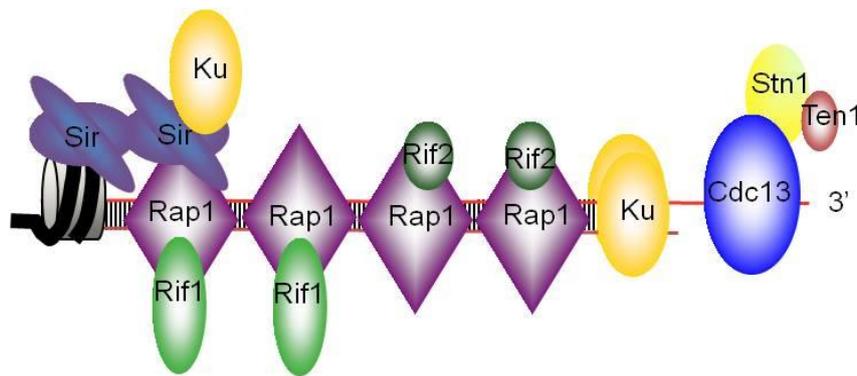


Figure 8 Structure nucléoprotéique du télomère chez *S. cerevisiae*. La protéine *Rap1* se fixe spécifiquement sur les répétitions d'ADN télomérique double-brins et interagit avec les protéines *Rif1*, *Rif2* et *SIR* à l'origine de l'hétérochromatine. La protéine *Cdc13* complexée aux protéines *Stn1* et *Ten1* se lie sur les répétitions télomériques simple-brin. L'hétérodimère *KU* se lie à la jonction entre l'ADN simple-brin et l'ADN double brin et à la protéine *Sir4* (Roy et al. 2004).

2.1. La protéine Rap1

De manière générale, les protéines se fixant spécifiquement à l'ADN télomérique double-brins ont en commun un domaine plus ou moins homologue au domaine de fixation à l'ADN appelé "télobox" (Lustig et al. 1990). La télobox contient un motif hélice-tour-hélice, apparenté aux répétitions de type Myb (Bilaud et al. 1997); (Broccoli et al. 1997). La protéine *Rap1* est essentielle à la viabilité cellulaire. En effet, *Rap1* est un activateur de la transcription au niveau de nombreux promoteurs (5% de la totalité des promoteurs de gènes chez la levure), notamment au niveau de promoteurs de gènes contrôlant la synthèse du ribosome (Lieb et al. 2001). Longue de 827 résidus, *Rap1* est constituée de trois domaines: un domaine N-terminal de type BRCT (BRCA1 C-Terminal) très conservé à travers les espèces. Il possède une activité de "bending" de l'ADN mais dont le rôle reste assez méconnu (Müller et al. 1994). Le second domaine est un domaine d'interaction avec l'ADN constitué de deux domaines Myb successifs qui peut lier de nombreuses séquences d'ADN de 12 à 14 paires de bases. Finalement, un domaine dans la région C-terminale de *Rap1* est appelé RCT (*Rap1* C-Terminus) et interagit avec plusieurs partenaires protéiques tels que les complexes *SIR* et *Rif* (Figure 9).

Au niveau des télomères et des loci de changement de type sexuel (*HMR* et *HML*), *Rap1* exerce une fonction répressive en servant de plateforme de recrutement de facteurs constituant l'hétérochromatine (Shore et Nasmyth 1987). Au sein des télomères, la protéine

Rap1 protège les extrémités télomériques des fusions en inhibant le système de réparation NHEJ (Non Homologous End Joining) (Pardo et Marcand 2005).

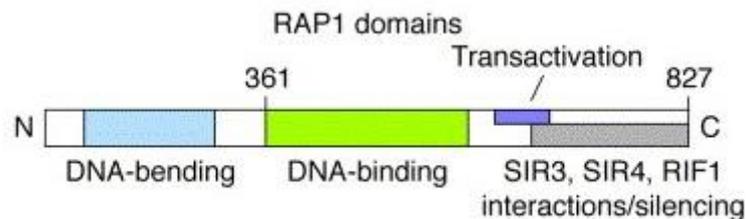


Figure 9 Structure de la protéine télomérique Rap1. La partie centrale de la protéine Rap1 contient un domaine de liaison à l'ADN. La région C-terminale contient les domaines d'interaction avec les protéines SIR et RIF importante pour le TPE et le contrôle de la longueur des télomères ainsi que le domaine de transactivation. La partie N-terminale de Rap1 constitue une large région non essentielle à la viabilité cellulaire qui serait impliquée dans des activités de régulation à travers le domaine BRCT de Rap1 ainsi que dans la torsion de l'ADN par Rap1 (Randall H. 2000).

2.2. Le complexe SIR

Des études menées chez la levure ayant pour but d'identifier des facteurs cellulaires impliqués dans la répression de la transcription ont mis en évidence des protéines codées par les gènes SIR (Silent Information Regulators) (Rine et Herskowitz 1987). Ces protéines SIR sont aussi responsables de l'extinction de gènes rapporteurs au niveau des séquences répétées de l'ADN telles que les loci de changement de type sexuel et le rDNA. Les gènes *SIR2*, *SIR3* et *SIR4* sont nécessaires à l'extinction des gènes des loci de changement de type sexuel (Rine et Herskowitz 1987) et des télomères (Gottschling et al. 1990) alors que seule *SIR2* est nécessaire à l'extinction des gènes du rDNA (Bryk et al. 1997); (Smith et Boeke 1997).

Le complexe SIR est composé de trois sous-unités Sir2, Sir3 et Sir4 qui interagissent entre elles et se lient aux queues N-terminales des histones H3 et H4 qui sont maintenues dans un état de faible acétylation par l'activité déacétylase de Sir2 (Johnson et al. 2009). La déacétylation des histones H3 et H4 renforce l'interaction de Sir3 et Sir4 avec les extrémités N-terminales et induit une structure plus compacte de la chromatine. La protéine Sir4 interagit également avec la protéine Rap1 et initie le réseau d'interaction protéine-protéine impliquant la protéine Rap1 liée aux télomères, les protéines SIR et les histones H3 et H4 hypoacétylées formant un complexe nucléoprotéique d'ordre supérieur stable qui rend l'ADN inaccessible.

2.3. Le complexe Rif

Les différents domaines d'interaction de Rap1 se sont révélés essentiels aux fonctions de la protéine. Lors d'un crible génétique visant à identifier des interactions protéine-protéine, il a été mis en évidence un facteur interagissant avec Rap1 et appelé Rap1-interacting factor 1 ou Rif1 (Hardy et al. 1992). La délétion du gène *RIF1* affecte le TPE et la régulation de la taille des télomères, ceux-ci étant rallongés de 200 à 300 pb. Un deuxième interacteur de Rap1, appelé Rif2 a été identifié et révèle des fonctions similaires à celles de Rif1 (Wotton et Shore 1997). Cependant, la délétion de *RIF1* combinée à celle de *RIF2* montre un effet synergique des deux mutations avec une augmentation de la taille des télomères allant de 600 pb à 2.5kb, révélant des fonctions différentes de Rif1 et Rif2 dans la régulation de la taille des télomères qui seront détaillées ci-après.

2.4. Le complexe CST

L'intégrité des télomères de la levure dépend non seulement du "télosome" formé par les protéines Rap1-Rif1-Rif2 présentées précédemment mais également du complexe CST. Ce complexe, formé des trois sous-unités Cdc13-Stn1-Ten1, se lie à l'ADN simple-brin télomérique. Il a été proposé que le complexe CST présente une similarité de structure avec le complexe hétérotrimérique "Replication protein A" (RPA) suggérant que le complexe CST serait un homologue fonctionnel de RPA spécifique de l'ADN simple-brin télomérique (Gao et al. 2007).

La fonction de "coiffe" du complexe CST dépend principalement de l'interaction de Cdc13 avec l'ADN télomérique et les protéines Stn1 et Ten1 (Nugent et al. 1996) (Puglisi et al. 2008) (Grandin et al.1997). La perte de fonction de la protéine Cdc13 mise en évidence dans le mutant thermosensible *cdc13-,1* entraîne une dégradation du brin télomérique riche en C et une activation des voies de signalisation des dommages à l'ADN (Lin et Zakian 1996).

En plus de sa fonction de protection du simple-brin télomérique, le complexe CST joue un rôle dans le recrutement de la télomérase *via* une interaction directe de Cdc13 avec la sous unité régulatrice de la télomérase, Est1 (Nugent et al. 1996) (Evans et Lundblad 1999). Enfin, la protéine Stn1 réprime l'activité de la télomérase à travers la compétition du domaine C-terminal de Stn1 avec Est1 pour la liaison à Cdc13 (Pennock et al. 2001); (Chandra et al. 2001).

2.5. L'hétérodimère KU

L'hétérodimère KU, très conservé dans les cellules eucaryotes, est formé de deux protéines de 70 et 80 kDa appelées respectivement yKu70 et yKu80. Il a tout d'abord été identifié comme un acteur du mécanisme de recombinaison homologue puis comme un acteur clé de NHEJ (Non Homologous End-Joining) (Jackson 2002). Son rôle dans l'homéostasie des télomères a été identifié pour la première fois chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* en 1998 (Gravel et al. 1998). Cette étude a mis en évidence un raccourcissement des télomères et une augmentation de l'ADN télomérique simple-brin G-riche dans un mutant *yku80Δ* montrant un rôle de protection contre les exonucléases. Son rôle de "régulateur positif" de la télomérase sera décrit dans la partie suivante. Enfin, il a été mis en évidence un rôle de l'hétérodimère dans l'effet de position au télomère (Boulton et Jackson 1998).

3. Réplication des extrémités et résection des télomères

A chaque division cellulaire, le processus de réplication permet à l'ADN d'être dupliqué afin d'être transmis à la cellule fille. A cause de leur polarité inversée, les deux brins néoformés sont synthétisés de manières différentes. Sur le brin direct ou "leading", la synthèse 5' vers 3' se fait dans le sens de progression de la fourche de réplication et donc de manière continue. Sur le brin indirect ou "lagging", la synthèse du brin complémentaire se fait de manière discontinue, par la synthèse de petits fragments d'ADN appelés les fragments d'Okazaki. Ceux-ci sont initiés grâce à une amorce ARN à partir de laquelle une polymérase va synthétiser le brin complémentaire jusqu'au fragment d'Okazaki précédent. Les amorces ARN sont ensuite éliminées et les deux extrémités d'ADN jointes grâce à l'intervention d'une ligase. Sur le brin direct, la réplication du télomère se fera jusqu'à l'extrémité, alors qu'à l'extrémité 5' du brin retardé, la machinerie de réplication ne va pas pouvoir répliquer la séquence dans sa totalité. La réplication des télomères induit donc deux extrémités d'ADN structurellement différentes; une extrémité franche sur le brin leading alors que le brin lagging se termine par une extrémité 3' sortante simple-brin (*Figure 10*).

La formation de l'ADN simple-brin riche en G au niveau du brin leading nécessite donc un processus de dégradation du brin 5' appelé "résection" qui fait intervenir le complexe MRX, composé de 3 sous-unités Mre11, Rad50 et Xrs2. La protéine Mre11 est une endonucléase spécifique du simple-brin qui présente également une activité 3'-5' exonucléase. La protéine Rad50 a une activité de liaison à l'ADN ATP-dépendante, et la protéine Xrs2

possède une activité hélicase. Il a été montré que la délétion de *MRE11* entraînait une réduction de la fixation des sous unités Est1 et Est2 de la télomérase en fin de phase S (Goudsouzian et al.2006). Par l'étude d'incorporation du BrdU il a été mis en évidence un défaut de recrutement de Est1 et Est2 en absence de *MRE11* seulement sur le brin leading (Faure et al. 2010).

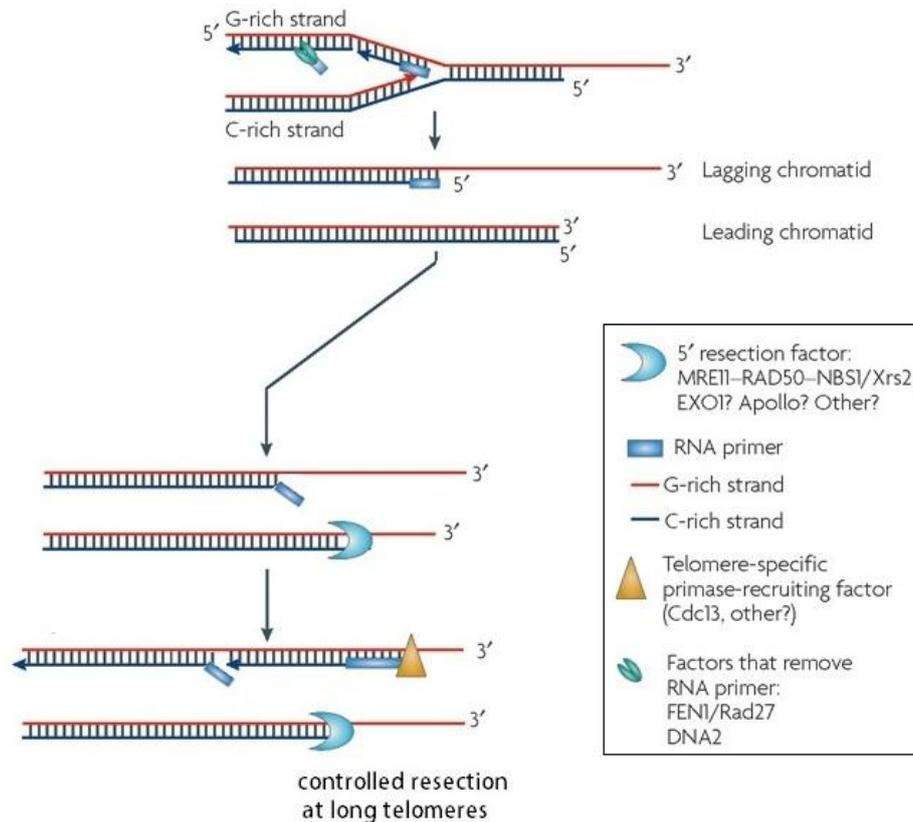


Figure 10 Raccourcissement des télomères lors de la réplication des extrémités. La synthèse du brin avancé se fait de manière continue dans le sens de progression de la fourche de réplication alors que celle du brin retardé se fait de manière discontinue par la synthèse de petits fragments d'ADN appelés les fragments d'Okazaki. Les amorces d'ARN servant à l'initiation de chaque fragment d'Okazaki sont hydrolysées et une enzyme ADN ligase lie bout à bout les fragments. A l'extrémité 5' du brin retardataire, l'élimination de la dernière amorce ARN va entraîner la perte d'une séquence d'ADN sur le brin indirecte. Des évènements de résection participent au raccourcissement des télomères.

Le laboratoire a développé une méthode permettant de distinguer si une protéine se fixait spécifiquement sur le télomère leading ou lagging. Cette méthode consiste à utiliser un mutant capable d'incorporer un analogue de la Thymidine, le BrdU (Bromodésoxy-Uridine). Après synchronisation des cellules et ajout de BrdU dans le milieu, le premier cycle cellulaire entraîne une incorporation du BrdU au niveau du télomère leading (riche en T). Après avoir chassé efficacement le BrdU, les cellules entrent dans un second cycle et le télomère marqué au BrdU au cycle précédent devient alors un télomère lagging. Grâce à une immunoprécipitation de la chromatine associée aux différentes protéines télomériques, la nature de l'ADN télomérique leading ou lagging est alors identifiée. Cette technique a permis de mettre en évidence que la protéine Cdc13 se fixe à la fois sur le télomère leading et le télomère lagging, et que le complexe MRX était nécessaire à sa fixation sur le télomère leading mais pas sur le télomère lagging. De la même manière, la protéine Mre11 ne se fixe que sur le télomère leading (Faure et al. 2010).

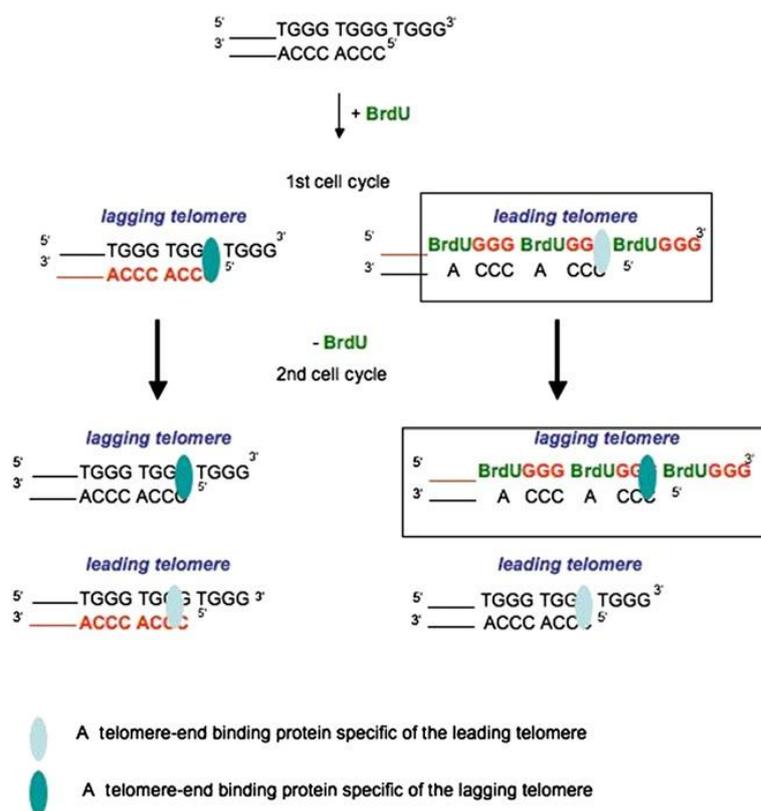


Figure 11 Méthode d'analyse de l'association des protéines télomériques sur les télomères leading et lagging. Le premier cycle cellulaire réalisé en présence de BrdU entraîne une incorporation de BrdU sur le brin leading riche en T contrairement au brin lagging dépourvu de T. Avant l'entrée des cellules dans un deuxième cycle cellulaire le BrdU est chassé du milieu. Au deuxième cycle le brin leading devient le brin lagging et se retrouve marqué au BrdU. (Faure et al. 2010). L'analyse du signal BrdU incorporé dans la chromatine associée à l'immunoprécipitation de protéines spécifiques du télomère permet de différencier si celles-ci sont associées au télomère leading, représenté ici en vert pale, ou au télomère lagging, représenté en bleu

Chez *S. cerevisiae*, la formation de l'extrémité 3' simple-brin et le recrutement de la télomérase nécessitent le complexe MRX dont la fixation aux télomères est elle-même inhibée sur les télomères longs (Viscardi et al. 2007). Ainsi, sur les télomères courts, la fixation de MRX favorise la résection en fin de phase de S. Nous allons voir dans le paragraphe suivant l'importance de cette étape dans le processus final d'élongation des télomères par la télomérase.

4. L'élongation des télomères par la télomérase

4.1. La télomérase

La télomérase de *S.cerevisiae* est constituée de l'ARN matrice *TLC1* (TeLomeric Component 1) et de la sous-unité catalytique Est2 (ever shorter telomere 2). Ce "core" télomérique est suffisant pour obtenir une activité télomérase *in vitro*. Les sous-unités Est1 et Est3 sont quant à elles essentielles pour le maintien de l'activité de la télomérase *in vivo* (Lundblad et Szostak 1989) et jouent un rôle essentiel *in vivo*. La protéine Est2 appartient à la famille des transcriptases inverses qui possède 7 domaines conservés très caractéristiques (motifs 1,2,A,B',C,D et E) (*Figure 12*) (Lingner et al. 1997) essentiels à l'activité catalytique de Est2. Des études sur la structure cristallographique de la télomérase chez *Tribolium castaneum* ont permis de révéler deux sous-domaines formés d'hélice alpha et de brin bêta formant une structure dite en "main droite" dont les domaines "paume" et "doigts" contiennent le site catalytique de l'enzyme et le "pouce" serait formé par le domaine C-terminal (Gillis et al. 2008) (*Figure 13*). La région N-terminale possède un domaine appelé TRBD (Telomeric RNA-Binding Domain) permettant la fixation de l'ARN matrice. La conservation de ces domaines très caractéristiques à travers l'évolution laisse à penser que la structure de la télomérase chez *S. cerevisiae* serait très proche de celle-ci.

L'ARN de la télomérase *TLC1*, d'une longueur d'environ 1200 nucléotides, est transcrit sous une forme précurseur contenant une coiffe mono-méthyle guanosine et une queue polyA. Sa maturation se fait à travers la perte de la queue polyA, l'acquisition d'une coiffe 5'-2,2,7 triméthyle guanosine (Chapon et al. 1997) et l'association avec les protéines hétéroheptamériques Sm (Seto et al. 1999). L'étude de la structure secondaire de *TLC1* a permis de mettre en évidence une partie centrale qui se prolonge par trois bras et joue ainsi un rôle de plateforme pour l'association du complexe télomérique (Zappulla et Cech 2004). En effet la partie centrale de *TLC1* lui permet d'interagir avec la sous-unité catalytique Est2 et

chacun des bras interagit respectivement avec la protéine Est1, l'hétérodimère KU et les protéines Sm (Figure 14).

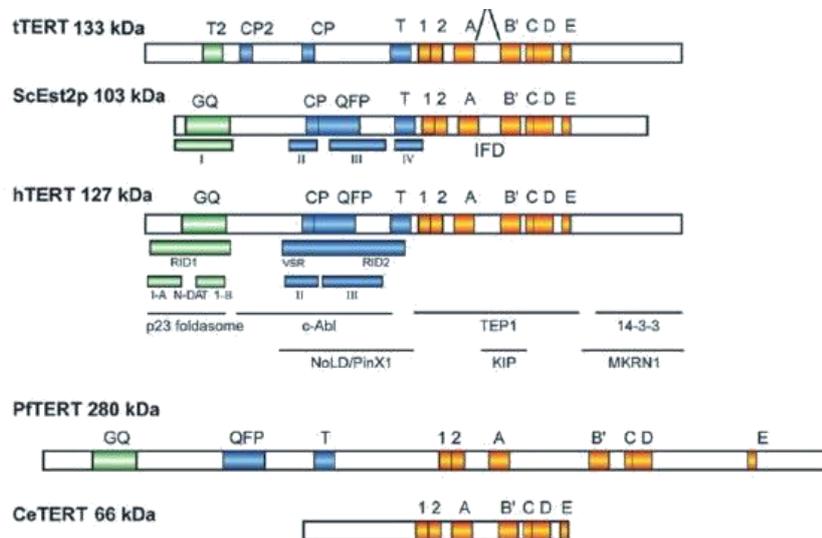


Figure 12 Structure et organisation des protéines de la famille TERT. L'organisation des protéines de la famille TERT est illustrée pour *Tetrahymena thermophila* (tTERT), *Saccharomyces cerevisiae* (ScEst2p), *Homo sapiens* (hTERT), *Plasmodium falciparum* (PfTERT) et *Caenorhabditis elegans* (CeTERT). Les caractéristiques des protéines TERT incluent les motifs RT (reverse transcriptase) (1, 2, A, B', C, D et E), le motif T télomérase-spécifique et les extensions C et N terminales (NTE, CTE). IFD désigne une insertion télomérase spécifique dans le domaine « finger » de la RT, entre les motifs conservés A et B'. Les motifs RT sont représentés en orange. Les domaines de forte affinité de fixation à l'ARN sont indiqués en bleu. Le domaine N-terminal, incluant des domaines de faible affinité pour l'ARN est illustré en vert. Les domaines d'interaction de TERT à d'autres protéines sont aussi représentés. RID = Interaction Domain. (Autexier et Lue 2006)

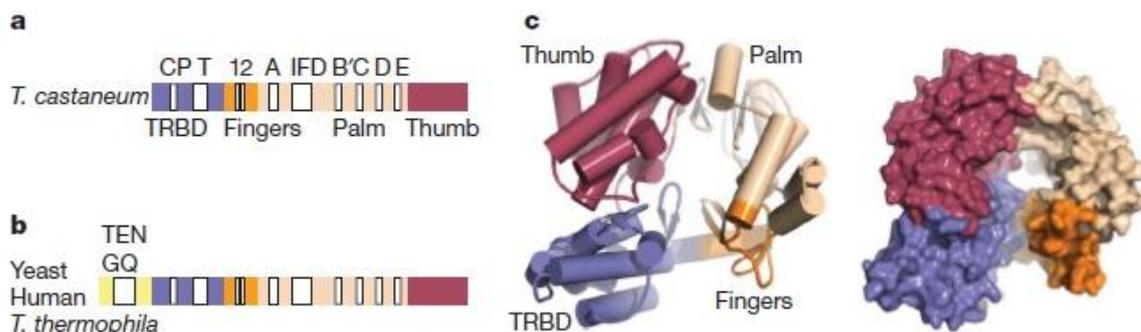


Figure 13 Structure de TERT chez *Tribolium castaneum* qui présente c) une forme de main droite avec des domaines "paume" et "doigts" contenant le site catalytique, le "pouce" formé par la partie C-terminale. La partie N-terminale contenant le domaine TRBD d'interaction avec l'ARN matrice. a) et b) présente une structure primaire très conservée entre les espèces qui permet de prédire une structure secondaire assez similaire (Gillis, Schuller, et Skordalakes 2008).

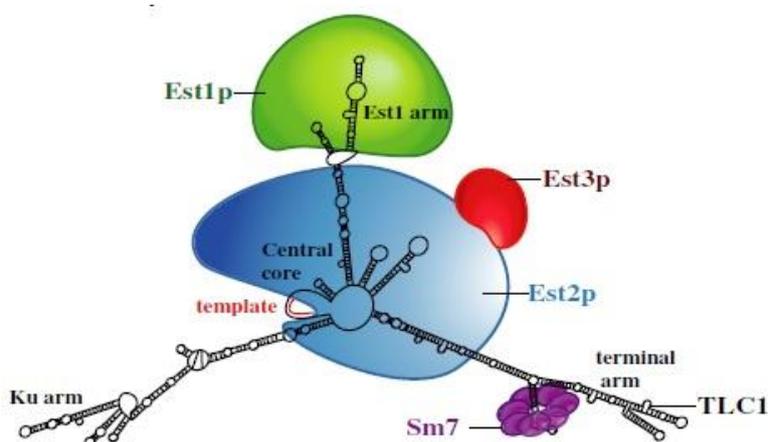


Figure 14 Structure de l'ARN *TLC1* mettant en évidence ses principaux domaines d'interaction avec les protéines Est2, Est1, l'hétérodimère KU et les protéines Sm. "Template" indique la région matrice de séquence CA₁₋₃. (Hug et Lingner 2006).

L'activité de la télomérase *in vivo* nécessite en plus du "core" télomérique, l'intervention de trois protéines appelées Est1, Est3 et Cdc13, également appelée Est4. La protéine Est1 interagit directement avec l'ARN *TLC1*. La protéine Est3 a été bien moins étudiée et son rôle de régulateur de la télomérase *in vivo* n'a pas été élucidé. Récemment, une étude a mis en évidence une interaction directe entre la protéine Est3 et le domaine N-terminal de la protéine Est2 *in vitro*, qui serait impliquée dans la stimulation de l'activité de la télomérase (Talley et al. 2011), mais cette interaction ne semble pas suffisante à l'assemblage de Est3 avec le complexe télomérase *in vivo*. En effet, une interaction entre les protéines Est3 et Est1 a été

également mise en évidence *in vitro* et permettrait l'activation de la fonction de Est1 (Tuzon et al. 2011) (Osterhage et al. 2006).

La protéine Cdc13 qui se fixe à l'ADN simple-brin télomérique, joue un rôle crucial dans le recrutement de la télomérase aux télomères *via* son interaction avec la protéine Est1 (Pennock et al.2001) (Voir ci-dessous)

4.2. Recrutement de la télomérase aux télomères

Le "core" télomérique (comprenant la sous unité catalytique Est2 et l'ARN matrice *TLC1*) est lié en phase G1 aux télomères protégés, à travers l'interaction de *TLC1* avec l'hétérodimère KU (Diede et Gottschling 2001) (*Figure 15*). En début de phase S, la télomérase est enlevée des télomères par un mécanisme non encore élucidé, alors que KU reste associé aux extrémités chromosomiques. En fin de phase S, le passage de la fourche de réplication déprotège transitoirement les télomères.

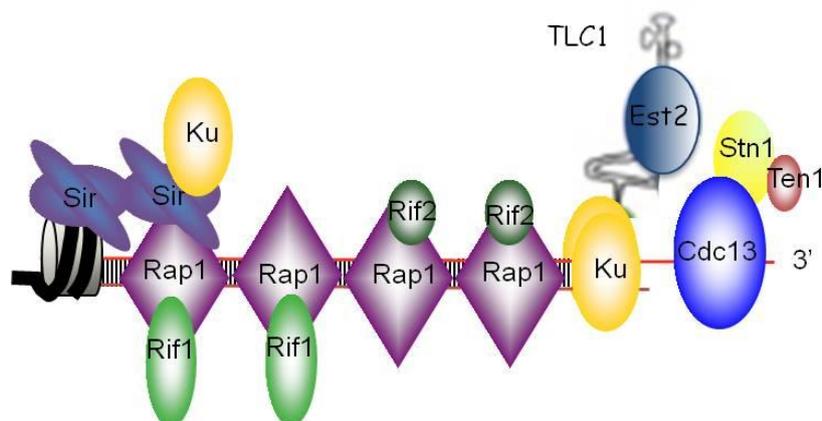


Figure 15 Le télomère et la télomérase en phase G1 du cycle cellulaire. *Le core télomérique Est2/TLC1 est lié au télomère en phase G1 du cycle cellulaire via l'interaction de TLC1 avec l'hétérodimère yKU.*

Plusieurs exonucléases (Exo1, Sae2 et Sgs1) (Bonetti et al. 2009) contribuent alors à la formation du simple-brin G-riche à travers un phénomène de résection 5' contrôlé par le complexe MRX, la cycline Cdk1 et possiblement Tel1 (Larrivée et al. 2004) (Goudsouzian et al.2006) (Ira et al. 2004). Deux études ont montré un rôle de Cdk1 dans la régulation du processus de formation de l'ADN télomérique 3' simple-brin. Cdk1 régulerait donc la nucléase responsable de la résection télomérique (Frank et al. 2006); (Vodenicharov et Wellinger 2006). En fin de phase S, les télomères acquièrent de façon transitoire des extensions G-riche de plus de 30 nucléotides (Wellinger et al. 1993). L'ADN simple-brin généré crée des sites de fixation pour la protéine télomérique Cdc13. Il a été montré que la phosphorylation de Cdc13

sur le résidu thréonine 308 était dépendante de Cdk1 et jouait un rôle important dans le recrutement de la télomérase aux télomères en fin de phase S/ début de phase G2. En effet, un mutant *cdc13-T308A* dans lequel le résidu Thréonine 308 est muté en Alanine non phosphorylable, présente une diminution de 30% du recrutement de Est1 en fin de phase S / début de phase G2 (Li et al. 2009). Il a été mis en évidence que la protéine Cdc13 était phosphorylée par Tel1 sur les résidus Sérines 225, 249 et 255 présents dans le domaine d'interaction de Cdc13 avec Est1. Il a été proposé que la phosphorylation des résidus S249 et S255 par Tel1 serait nécessaire au recrutement de la télomérase et au maintien de la longueur des télomères (Tseng et al. 2006). Ce modèle a été récemment remis en cause par une étude publiée en 2010, qui montre que les résidus sérines décrits précédemment sont bien nécessaires à l'interaction Cdc13 / Est1 mais que cette interaction est indépendante de la fonction de Tel1. De plus, l'analyse des phospho-isoformes de Cdc13 après traitement à la lambda phosphatase n'est pas modifiée dans les mutants S249Q et S255Q comparé aux cellules sauvages ni dans des mutants *tell1Δ* ou *mec1Δ*. Finalement, un mutant de Cdc13 dans lequel les sites potentiels de phosphorylation par Mec1 ou Tel1 ont été modifiés, conserve son interaction avec la protéine Est1 (Gao et al. 2010). Le modèle actuel est que des modifications post-traductionnelles de Cdc13 régulent l'interaction de Cdc13 avec Est1 au détriment de Stn1 (Li, et al. 2009). L'interaction entre Cdc13 et Est1 associé à Est2/TLC1-Est3 permet le recrutement de l'holoenzyme télomérase (*Figure 16*). Le rôle de la protéine Est1 ne se restreint pas seulement au recrutement de la télomérase aux télomères. En effet, il a été montré qu'un mutant de Est1 dans lequel la télomérase (Est2) est effectivement recrutée au simple-brin télomérique entraîne un raccourcissement des télomères (Evans et Lundblad 2002). Finalement, une étude récente met en évidence une interaction entre les protéines Est1 et Est2 *in vitro* indépendante de l'ARN *TLC1* qui pourrait être essentielle pour l'étape d'élongation du télomère par la télomérase (DeZwaan et Freeman 2009) (voir ci-après).

4.3. La reconnaissance préférentielle du télomère court

Chez *S. cerevisiae*, la longueur constante des télomères indique qu'il existe un système de régulation négative de la télomérase provenant du télomère lui-même. En effet, il a été montré que la fréquence d'élongation d'un télomère diminue progressivement avec l'augmentation de sa taille et donc avec l'accumulation des protéines Rap1 se liant aux répétitions télomériques nouvellement synthétisées (Marcand et al. 1999) (Teixeira et al. 2004).

La protéine Tel1 (TELOmere maintenance 1) initialement décrite pour son implication dans le métabolisme des télomères (Greenwell et al. 1995), appartient à la famille des Phosphatidyl Inositol Kinase (PIK). et phosphoryle ses cibles en utilisant un groupement phosphate provenant du phosphatidylinositol. La famille des PIK contient les protéines ATM (Ataxia Telangesia Mutated) et ATR (ATM and Rad3-related) chez l'homme, dont les homologues chez la levure *S. cerevisiae* sont les protéines Tel1 et Mec1 respectivement. Des études génétiques ont montré que les kinases Mec1 et Tel1 jouent un rôle dans l'accessibilité de la télomérase aux télomères (Ritchie et Petes 2000) (Chan et al., 2001). Alors que la protéine Mec1 a un rôle mineur dans le recrutement de la télomérase au télomère, Tel1 y joue un rôle central. (Goudsouzian et al. 2006). Des études génétiques montrent qu'il existe une relation d'épistasie entre les mutants *tell1*Δ et *mrp1*Δ, indiquant que Tel1 et MRX participent à une même voie de régulation de la taille des télomères (Ritchie et Petes 2000). Une interaction entre le complexe MRX et la protéine Tel1 *via* la région C-terminal de Xrs2 est mise en évidence (Nakada et al. 2003). Quatre laboratoires ont découvert que la kinase Tel1 ainsi que la télomérase se lient préférentiellement aux télomères courts de façon dépendante de Xrs2 (Sabourin et al. 2007) (Bianchi et Shore 2007a) (Hector et al. 2007) (Arneric et Lingner 2007). Afin d'étudier un télomère court, l'équipe de Virginia Zakian a utilisé un système dans lequel le télomère gauche du chromosome VII (VII-L) a été modifié par l'introduction de deux sites FRT adjacents à des séquences télomériques (Marcand, Brevet, et Gilson 1999). L'induction d'une flipase Flp1 induite par l'ajout de galactose agit spécifiquement sur ses sites cibles FRT (FLP recombinase target) et entraîne l'excision d'un fragment subtélomérique d'environ 1700 pb menant à un raccourcissement du télomère VII-L d'environ 200 pb comparé aux autres télomères présents dans la cellule. Des expériences de ChIP montrent ainsi que Est1 et Est2 se fixent sur le télomère court en quantité 3 fois plus élevée que sur un télomère sauvage. Cette préférence de Est1 et Est2 pour les télomères courts est alors perdue dans un mutant *tell1*Δ. De la même façon, alors que la fixation de Tel1 sur un télomère sauvage n'est détectable qu'en fin de phase S / début de phase G2, sa fixation sur le télomère court VII-L, bien que faible est détectée dès la phase G1 puis augmente à travers le cycle cellulaire pour atteindre un niveau de fixation 7 fois plus élevé en fin de phase S que sur un télomère sauvage (Sabourin et al. 2007). A l'inverse de Est1 et Est2, la fixation des protéines yKu80, Cdc13 et Rif1 sur le télomère court VII-L n'est pas augmentée. De manière intéressante, on observe une diminution de moitié de la fixation de Rif2 sur le télomère court (McGee et al. 2010). *In vitro*, Rif2 interagit comme Tel1 avec la protéine Xrs2. Il pourrait donc exister une compétition entre les protéines Tel1 et Rif2 pour la fixation à Xrs2 et ainsi,

la baisse de fixation de Rif2 sur le télomère court pourrait favoriser l'augmentation de la fixation de Tel1 et de la télomérase (McGee et al. 2010) (Figure 16).

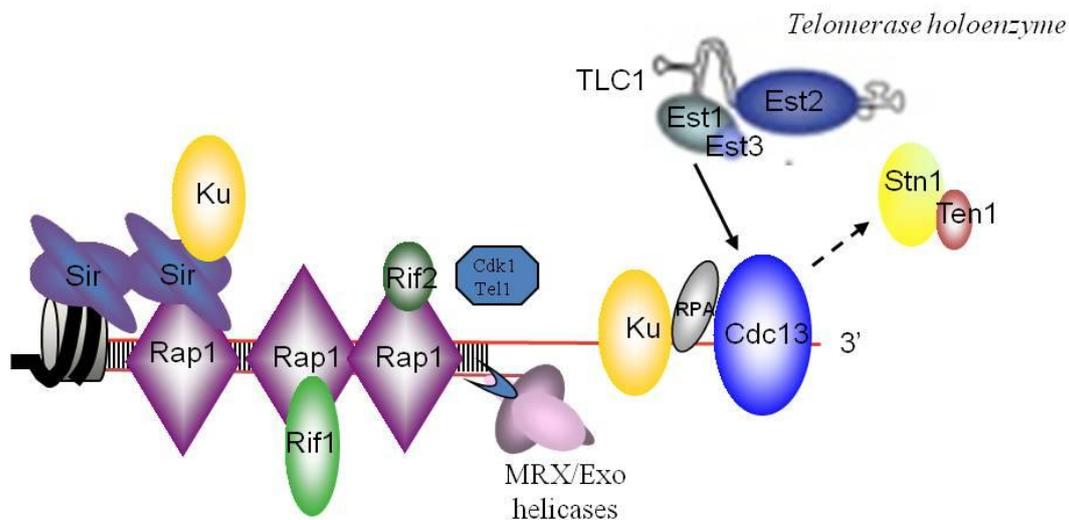


Figure 16 Recrutement de la télomérase en fin de phase-S sur les télomères courts. *Tel1* et *Rif2* interagissent toutes deux avec *Xrs2* *in vitro*. Alors que la quantité de *Tel1* sur un télomère court augmente, celle de *Rif2* diminue. Des modifications post-traductionnelles de *Cdc13* par *Tel1* régulent l'interaction entre *Cdc13* et *Est1* au détriment de *Stn1*. L'interaction entre *Cdc13* et *Est1* associée à *Est2/TLC1-Est3* permet le recrutement de l'holoenzyme télomérase.

4.4. RPA facilite l'activité de la télomérase aux télomères

Des travaux en cours de publication menés dans le laboratoire ont montré que RPA et *Cdc13* étaient tous deux recrutés aux télomères en fin de phase S (Luciano et al, EMBO J). Grâce à la technique de différenciation des télomères leading et lagging par incorporation de BrdU, il a été montré que RPA se fixe sur les télomères leading et lagging mais que uniquement sa fixation sur le télomère leading est affectée par un défaut de résection du mutant *mre11Δ*. De plus, grâce à des expériences de co-immunoprécipitation (CoIP) une interaction entre RPA et l'ARN *TLC1* ainsi qu'entre RPA et yKu a été détectée en fin de phase S, lorsque RPA, *Cdc13*, *Est1* et *Est2* sont recrutés au télomère. En réalisant des CoIP soit dans un mutant *tlc1Δ48* qui abolit l'interaction yKu/*TLC1* soit dans un mutant *est1Δ*, il a été mis en évidence que l'interaction entre RPA et la télomérase était à la fois dépendante de yKu et de *Est1*. L'ensemble de ces résultats indique que RPA, en interagissant avec yKu et *Est1*, facilite l'action de la télomérase.

4.5. L'élongation et la processivité de la télomérase

La processivité de la télomérase est définie comme sa capacité à ajouter des répétitions télomériques tout en restant fixée au télomère. Chez *S. cerevisiae*, la télomérase présente une

faible processivité (Greider 1991). En effet, après une ou deux étapes d'élongation, elle va, au moment de la translocation, se dissocier du télomère (Prescott et Blackburn 1997); (Fulton et Blackburn 1998) (*Figure 17*). Durant un cycle cellulaire, la télomérase va ainsi pouvoir ajouter en moyenne 44 nt pour des télomères d'environ 200 pb (Teixeira et al. 2004). Une étude montre qu'au cours d'un cycle cellulaire, la télomérase est capable d'allonger un même télomère en utilisant deux substrats différents. Pour cela, une souche diploïde est formée à partir d'un croisement entre un mutant *est1Δ* possédant un ARN *TLC1* modifié appelé *tlc1-tm* et une souche sauvage. La nature des séquences ajoutées sur le télomère VI-R est alors analysée et révèle des additions télomériques issues à la fois de la matrice *TLC1* et de la matrice *tlc1-tm* (Chang et al. 2007). En utilisant ce même système, il est mis en évidence que la délétion de *TELL1* rend la télomérase incapable d'agir de façon processive sur les télomères courts donc incapable d'ajouter des répétitions télomériques.

Une protéine décrite pour diminuer la processivité de la télomérase est la protéine Pif1. En effet cette hélicase qui présente une activité préférentielle pour les hybrides ADN/ARN va favoriser le décrochement de l'ARN *TLC1* de son substrat télomérique. Cette hélicase ainsi que son rôle dans la régulation de la taille des télomères va maintenant être décrite dans la partie suivante.

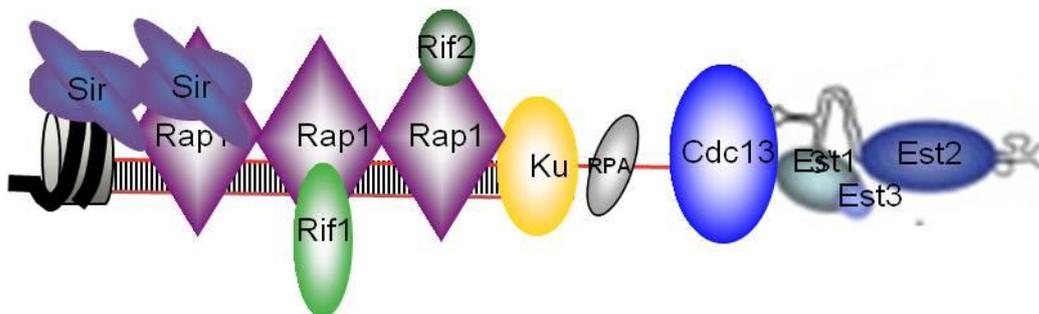


Figure 17 Elongation du télomère et translocation de la télomérase. Après reconnaissance du substrat télomérique et hybridation de la matrice ARN *TLC1*, la télomérase copie quelques nucléotides avant de se transloquer et de repositionner l'ARN matrice afin de répéter l'opération et de former ainsi les répétitions télomériques formant d'ADN simple-brin 3' sortant.

4.6. La synthèse du brin complémentaire

Après l'élongation de l'ADN simple-brin 3', la synthèse du brin complémentaire se fait par l'intervention de la machinerie conventionnelle de réplication. En effet, une expérience double hybride a mis en évidence une interaction entre la région N-terminale de la protéine Cdc13 et la région C-terminale de la polymérase Pol1 (Qi et Zakian 2000). Pol1 est la sous-unité catalytique du complexe ADN polymérase alpha qui, grâce à son activité primase est

capable d'initier la réplication (Waga et Stillman 1998). Pol12, la sous-unité régulatrice, est quant à elle capable d'interagir avec Stn1 (Grossi et al. 2004).

De façon similaire au phénotype observé dans des mutants du complexe ADN polymérase alpha (Pol α), un mutant *cdc13-5* a été mis en évidence comme présentant une surélongation de l'ADN sb G-riche par la télomérase ainsi qu'un défaut dans la synthèse du brin complémentaire. La surexpression de la protéine Stn1 est alors capable de restaurer les défauts observés dans les mutants de Pol α ainsi que dans le mutant *cdc13-5* (Chandra et al. 2001). De plus, un mutant *cdc13-2* présente un défaut d'interaction à la fois avec Est1 ainsi qu'avec Stn1. Il existerait donc une compétition entre les protéines Est1 et Stn1 pour la fixation à Cdc13. La première favoriserait l'élongation de l'ADN simple-brin 3' par la télomérase alors que la deuxième favoriserait la synthèse du brin complémentaire par le complexe Pol α .

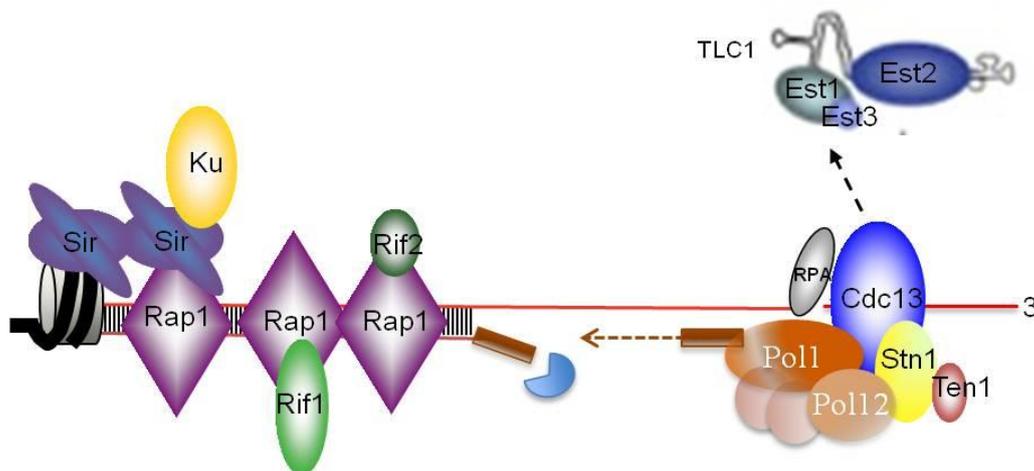


Figure 18 Synthèse du brin complémentaire. *Le recrutement du complexe polymérase α nécessaire à l'initiation de la synthèse du brin complémentaire se fait à travers la compétition des protéines Est1 et Stn1 pour la fixation à Cdc13. L'interaction des sous-unité Pol1 et Pol12 avec les protéines Cdc13 et Stn1 respectivement participe à ce processus.*

4.7. Balance entre résection/recrutement de la télomérase/Synthèse du brin complémentaire

Le maintien de la taille des télomères résulte d'un équilibre entre le processus de résection, le recrutement de la télomérase et la synthèse du brin complémentaire.

La protéine Rap1 qui se fixe sur les répétitions télomériques régule négativement la télomérase à travers un mécanisme de "comptage" des répétitions télomériques. En effet, le fait de cibler artificiellement les protéines Rap1 sur un télomère entraîne le raccourcissement de celui-ci (Marcand et al. 1997). Les protéines Rif1 et Rif2 interagissant avec Rap1, jouent

un rôle majeur dans ce processus, leur mutation entraînant un allongement des télomères dépendant de la télomérase (Wotton et Shore 1997); (Teng et al. 2000). Plusieurs études ont proposé l'idée que Rif1 et Rif2 régulent la longueur des télomères par des mécanismes différents (Wotton et Shore 1997); (Levy et Blackburn 2004); (Hirano, Fukunaga, et Sugimoto 2009). En plus de réguler négativement la longueur des télomères, Rap1 et Rif2 inhibent le processus NHEJ aux télomères. En effet, l'association du complexe MRX aux télomères dans des cellules *rif2Δ* et *rap1ΔC* est augmentée ce qui suggère que Rap1 et Rif2 inhibent l'action du complexe MRX en inhibant son recrutement aux télomères ayant pour conséquence de diminuer la dégradation nucléolytique au télomère (Bonetti, Clerici, Anbalagan, et al. 2010); (Hirano, Fukunaga, et Sugimoto 2009). La protéine Rif1 est quant à elle nécessaire à la viabilité des cellules qui présentent un défaut de protection du télomère causé par une réduction de l'activité des protéines Cdc13 et Stn1 ce qui lui confère un rôle de soutien de la fonction du complexe CST, soit dans la synthèse du brin télomérique complémentaire par son couplage avec le complexe polymérase α , soit en inhibant l'accès des nucléases aux extrémités télomériques (Anbalagan et al. 2011).

IV. L'hélicase Pif1

La protéine Pif1 (Petite integration frequency 1) a été identifiée pour la première fois en 1983, chez *S. cerevisiae*, comme nécessaire à la réparation de l'ADN mitochondrial après induction de dommages à la lumière Ultra Violet (UV) ou de traitement au Bromure d'Ethidium (Foury et Kolodynski 1983). Dix ans plus tard, la même équipe purifia la protéine Pif1 à partir des mitochondries et mit en évidence une activité hélicase 5'-3' ATP-dépendante (Lahaye et al. 1991). L'hélicase Pif1 est présente dans la cellule sous deux formes, une forme mitochondriale et une forme nucléaire. La traduction des deux isoformes de Pif1 se fait à partir de deux codons initiateurs séparés de 40 codons. La traduction réalisée à partir du premier codon produit une forme de Pif1 pré-mitochondrial qui possède un signal d'adressage à la mitochondrie et qui sera clivée lors de son import dans la mitochondrie. La traduction réalisée à partir du deuxième codon produit la forme nucléaire de Pif1 (Figure 19). L'expression des isoformes de Pif1 est régulée au cours du cycle cellulaire avec un taux maximal d'expression en fin de phase S, début de phase G2 (Vega et al. 2007).

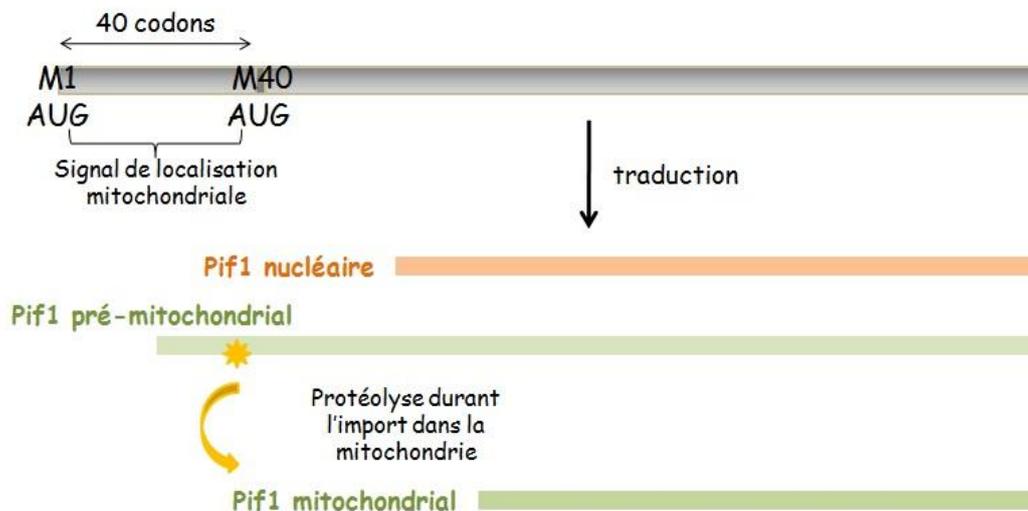


Figure 19 Synthèse des isoformes de Pif1. L'hélicase Pif1 est présente dans la cellule sous deux formes: mitochondriale et nucléaire. Le codon initiateur M1 permet la traduction de la forme pré-mitochondriale de Pif1 qui possède un signal d'adressage à la mitochondrie en région N-terminale qui est clivé durant l'import dans la mitochondrie. Le codon initiateur M2 permet la traduction de la forme nucléaire de Pif1.

L'analyse de différents génomes a permis de définir, l'hélicase Pif1 découverte chez *S. cerevisiae*, comme le premier membre d'une famille d'hélicases très conservées chez les Eucaryotes. Certains organismes tels que *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*

possèdent, comme *S. cerevisiae*, deux familles d'hélicases Pif1 alors que les Eucaryotes supérieurs et les métazoaires n'en possèdent qu'une seule. Les membres de la famille des hélicases Pif1 possèdent tous un domaine ATPase/hélicases très conservé variant de 400 à 500 acides aminés mais ont en revanche des domaines N/C-terminaux variables. Une analyse par alignement de séquences met en évidence sept motifs conservés (I, Ia, II, III, IV, V et VI) ainsi que trois motifs partagés avec l'homologue RecD chez la bactérie *E.coli*.

L'étude de l'hélicase Pif1 a finalement permis de mettre en évidence un rôle d'inhibiteur de l'élongation télomérique et de la formation de télomère *de novo* au niveau de cassures double-brins de l'ADN (Schulz et Zakian 1994); un rôle dans la résolution de structures particulières de l'ADN tel que les G-quadruplexes (Ribeyre et al. 2009) (Lopes et al. 2011) (Paeschke, Capra, et Zakian 2011) et enfin, un rôle dans la maturation des fragments d'Okazaki (Budd, Reis, Smith, Myung, et Campbell 2006a); (Rossi et al. 2008); (Pike et al. 2009). Ces différents aspects vont être développés dans cette partie.

1. Rôle de l'hélicase Pif1 dans la réplication

1.1. Pif1 participe à la synthèse des fragments d'Okazaki

Nous avons vu précédemment que la polarité inversée des deux brins d'ADN impliquait deux systèmes de réplication. Sur le brin leading, la synthèse se fait dans le sens de progression de la fourche de réplication et donc de manière continue. Sur le brin lagging, la synthèse du brin complémentaire se fait de manière discontinue, par la synthèse de fragments d'ADN appelés les fragments d'Okazaki. Chaque fragment d'okazaki mesure entre 100 et 150 nt (Gordenin et al. 1997). Chez *S. cerevisiae*, environ 100 000 fragments sont créés à chaque cycle de réplication. Ceux-ci sont initiés grâce à l'activité primase du complexe Pol α qui synthétise une amorce ARN d'environ 10 à 12 nt, suivie par une séquence d'ADN d'environ 20 à 30 nt (Rossi et al. 2006); (Burgers 2009). Ce nouveau complexe matrice/amorce est ensuite reconnu par le facteur de réplication C (RFC) qui recrute à son tour la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) capable de remplacer la primase Pol α par la polymérase Pol δ . Pol δ remonte le brin matrice et synthétise un nouveau fragment d'Okazaki jusqu'à rencontrer l'extrémité 5' du précédent, qu'elle peut dérouler afin de former un ADN simple-brin sortant. Ce dernier est clivé par une Flap endonucléase de structure spécifique, appelée FEN-1 et les deux extrémités d'ADN créées jointes grâce à l'intervention de la DNA ligase I (Liu, Kao, et Bambara 2004).

Une petite fraction pourrait échapper au clivage immédiat de FEN-1 et ainsi Pol δ déroulerait une portion d'ADN simple-brin plus longue, d'environ 30 nucléotides. Ce second modèle fait alors intervenir FEN-1 mais également la protéine Dna2. Dna 2 possède une activité nucléase spécifique de l'ADN simple-brin ainsi qu'une activité hélicase 5'-3' ATP-dépendante. Le simple-brin sortant d'environ 30 nucléotides est recouvert par la protéine de réplication A (RPA). Un modèle a été établi en 2001 grâce à la reconstitution *in vitro* de la structure des fragments d'Okazaki. Pour cela, des oligonucléotides double-brins marqués radioactivement sur une extrémité d'ADN sortante, ont été synthétisés afin de reconstituer différents substrats. Les différents acteurs étudiés tels que RPA, FEN-1 et Dna2 sont ajoutés dans le milieu de réaction et la résolution des structures est étudiée par Southern blot. Cette étude a montré que l'ajout de RPA inhibe l'activité de clivage de FEN-1 mais augmente celle de Dna2. Afin d'établir la chronologie des différentes réactions de clivage, une analyse des différents produits de réaction a été réalisée au cours du temps. Celle-ci montre que les produits générés par Dna2 apparaissent plus rapidement que ceux générés par FEN-1 et finissent par disparaître au cours du temps, alors que les produits générés par FEN-1 augmentent. En revanche, sans la présence initiale de Dna2, aucune activité de FEN-1 n'est observée. Ce modèle propose alors que l'ADN 5' simple-brin sortant qui n'a pas été clivé immédiatement par FEN-1 est rallongé jusqu'à atteindre une longueur d'environ 30 nt qui permet la fixation de RPA. La présence de RPA inhiberait l'activité de clivage de FEN-1. Cette structure serait résolue par Dna2 qui va cliver l'ADN en petits fragments, jusqu'à laisser une petite extrémité d'ADN 5' sortante qui, ne pouvant plus être fixée par RPA va être clivée par FEN-1 juste avant que les extrémités d'ADN soient jointes par la ligase I (S.-H. Bae et al. 2001).

Un rôle de Pif1 dans la synthèse des fragments d'Okazaki a été décrit pour la première fois en 2006. Cette étude a montré que la délétion de *PIF1* restaure la létalité d'un mutant *dna2 Δ* (Budd et al.2006). De plus, Pif1 interagirait avec Pol δ durant la réplication de l'ADN. Cette étude propose donc que le formation du brin 5' sortant ferait intervenir l'hélicase Pif1 en plus de Pol δ . L'action combinée de Pol δ et de Pif1 favoriserait l'allongement du brin 5' sortant qui nécessite ensuite la présence de Dna2 pour son clivage. La délétion de *PIF1* empêcherait le rallongement de l'ADN 5' sortant qui pourra être clivé par FEN-1 sans nécessiter la présence de Dna2 (Budd et al.2006). Ce n'est que 3 ans plus tard que la reconstitution de la synthèse des fragments d'Okazaki *in vitro* a permis de confirmer ce modèle (Pike et al. 2009) (*Figure 20*).

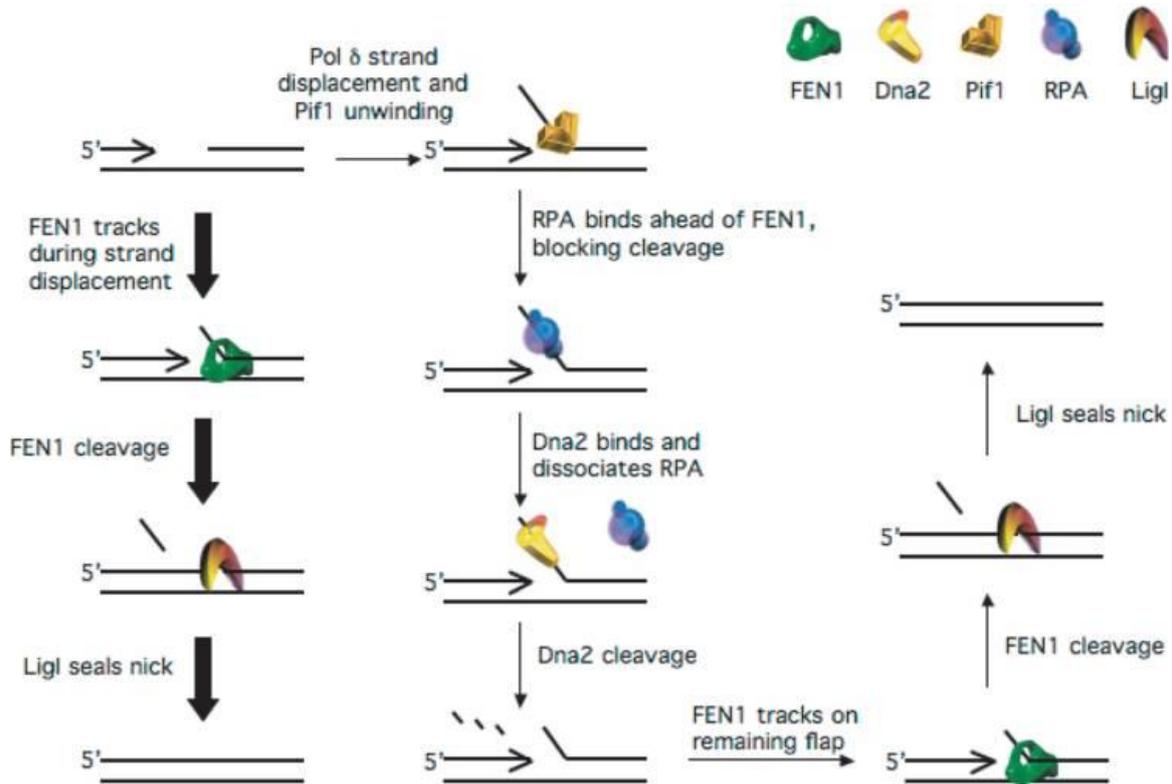


Figure 20 Mise en évidence des deux voies de synthèse des fragments d'Okazaki. La synthèse des fragments d'Okazaki nécessite une amorce ARN. A partir de cette amorce, Pol δ synthétise le brin complémentaire jusqu'à ce qu'elle rencontre l'amorce en amont et génère un ADN 5' sortant. Ce dernier va être coupé par l'endonucléase spécifique de structure FEN-1 qui a une activité 5'flap endonucléase. Les 2 extrémités générées vont être liguées par la ligase I. Une petite portion va échapper au clivage immédiat de FEN-1 et, grâce à une action commune, Pif1 et Pol δ vont rallonger la taille du flap générant ainsi un long ADN 5' simple-brin. RPA va fixer ce simple-brin inhibant ainsi l'activité de clivage de FEN-1. C'est alors Dna2, qui grâce à son activité nucléase, va réduire la taille de l'ADN 5' sortant jusqu'à ce qu'il soit suffisamment court pour ne plus fixer RPA. Comme initialement, FEN-1 va cliver l'ADN 5' sortant et les extrémités générées vont être liguées par la ligase I.

1.2. Pif1 participe à la résolution des structures G-Quadruplexes

L'analyse des génomes de divers organismes de la bactérie *E.coli* jusqu'à l'homme a montré l'existence d'un grand nombre de séquences riches en guanines, capables de former, *in vitro*, des structures particulières appelées les G-quadruplexes ou G4 qui ont été caractérisées pour la première fois en 1962 (Gellert et al.1962). Les G-quadruplexes sont formés de structures secondaires à quatre brins constituant ainsi des plateaux de guanines également appelés "quartets". Ils peuvent être formés par une seule molécule d'ADN (intramoléculaires) ou plusieurs (intermoléculaires). Un minimum de deux quartets adjacents, mais idéalement trois ou plus, sont nécessaires pour la formation d'un G-quadruplexe stable. L'évidence de la formation de ces structures *in vivo* émergea en 2004, suite à leur observation en microscopie électronique (Duquette et al. 2004). Une analyse bioinformatique à grande échelle du génome

de différentes espèces a permis de localiser ces G-quadruplexes principalement au niveau des télomères, du rDNA, des sites de régulation transcriptionnelle (Huppert et Balasubramanian 2007); (Hershman et al. 2008); (Rawal et al. 2006) ainsi qu'au niveau des sites de cassures mitotiques et méiotiques. *In vitro*, plusieurs hélicases à ADN sont capables, en absence de ligands, de dérouler ces structures G4, telles que BLM, WRN ou FANCI chez l'homme, ou encore Sgs1 chez *S. cerevisiae* (Fry et Loeb 1999); (Huber et al. 2002); (Mohaghegh et al. 2001) (Wu et al. 2008).

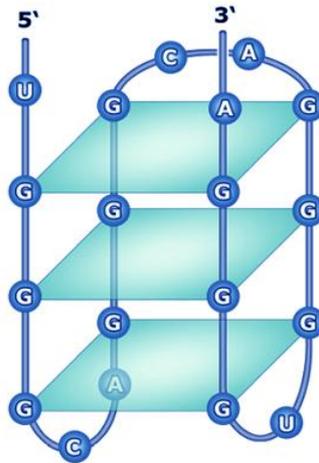


Figure 21 Représentation de la structure des G-quadruplexes formés dans des régions riches en guanines. Ces structures secondaires à quatre brins d'ADN intra ou intermoléculaires forment des plateaux de guanines également appelés "quartets" dont au moins deux sont nécessaires à la stabilité de la structure.

En 2009, une étude a mis en évidence un rôle de Pif1 dans la stabilité des G-quadruplexes. Dans cette étude, un allèle du minisatellite humain d'environ 1.8 kb, appelé CEB1-1.8 a été inséré dans le génome de la levure *S. cerevisiae* (Figure 22 A). Cet allèle, riche en guanine, composé de 42 répétitions en tandem de taille variant entre 36 à 43 pb est capable *in vitro*, de former des G-quadruplexes (Lopes et al. 2006). *In vitro*, Pif1 est capable de dérouler les structures G4 formées par CEB1. *In vivo*, en absence de l'hélicase Pif1, on observe que la fréquence de réarrangements par contractions ou expansions de l'allèle parental est 20 fois plus élevée comparé au cellules sauvages (Figure 22 B). En revanche, d'autres hélicases telles que Sgs1, Dna2; Rrm3 ou Mph1 n'ont aucun effet sur la stabilité du minisatellite CEB1 (Ribeyre et al. 2009). La capacité de l'hélicase Pif1 à résoudre ces structures secondaires de type G4 suggère que Pif1 contribue à la stabilité du génome en prévenant les réarrangements qui pourraient survenir suite à la formation des structures G4 *in vivo*.

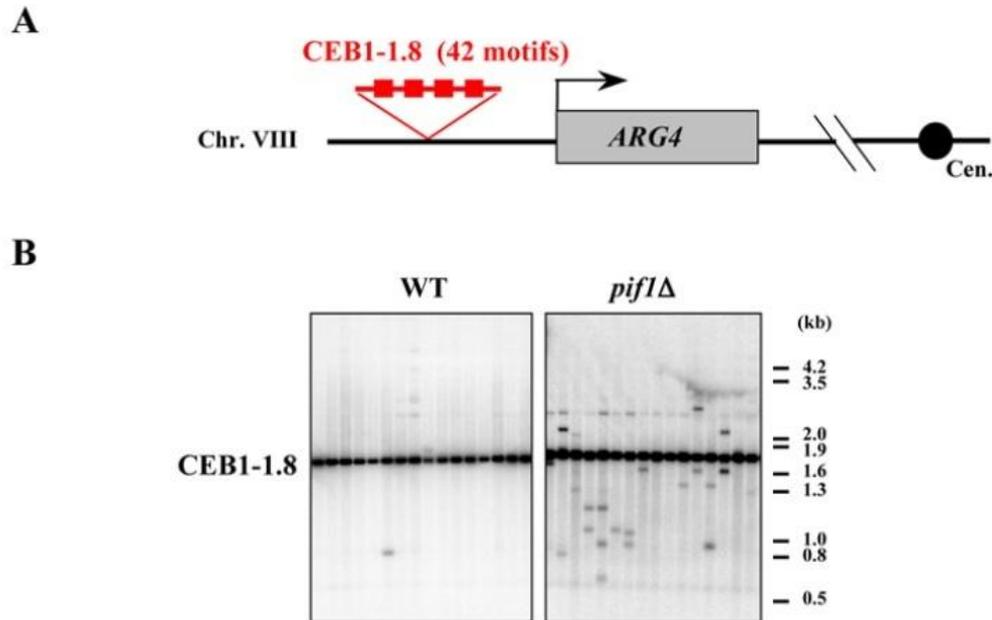


Figure 22 Instabilité du minisatellite CEB1 dans le mutant *pif1*Δ. (A) Insertion de l'allèle CEB1-1.8 composé de 42 répétitions en tandem au niveau du chromosome VIII de *S. cerevisiae*. (B) Analyse par Southern blot de l'instabilité du minisatellite CEB1 dans une souche sauvage et dans un mutant *pif1*Δ. Chaque puit contient l'ADN génomique extrait à partir de 12 colonies indépendantes, digéré par l'enzyme *AluI* et hybridé avec une sonde CEB1-0.6 (Ribeyre et al. 2009).

Afin de mieux comprendre le rôle de Pif1, la même équipe réalisa en 2011 une étude visant à mesurer l'instabilité du minisatellite CEB1 inséré à côté de l'ARS305 (autonomous replication sequence) sur le brin avancé (orientation I) ou sur le brin retardé (orientation II). Dans les cellules sauvages, CEB1 semble assez stable avec des taux de 0.5% de réarrangements pour les deux orientations. Dans les cellules *pif1*Δ, l'instabilité du minisatellite en orientation II est assez similaire au sauvage avec un taux de réarrangements de 2%. En revanche, 56% de réarrangements sont observés lorsque CEB1 se trouve sur le brin avancé. Des résultats similaires ont été obtenus avec le mutant catalytique de Pif1 (*pif1-K264A*) montrant que l'activité hélicase de Pif1 joue un rôle sur la stabilisation du minisatellite en orientation I.

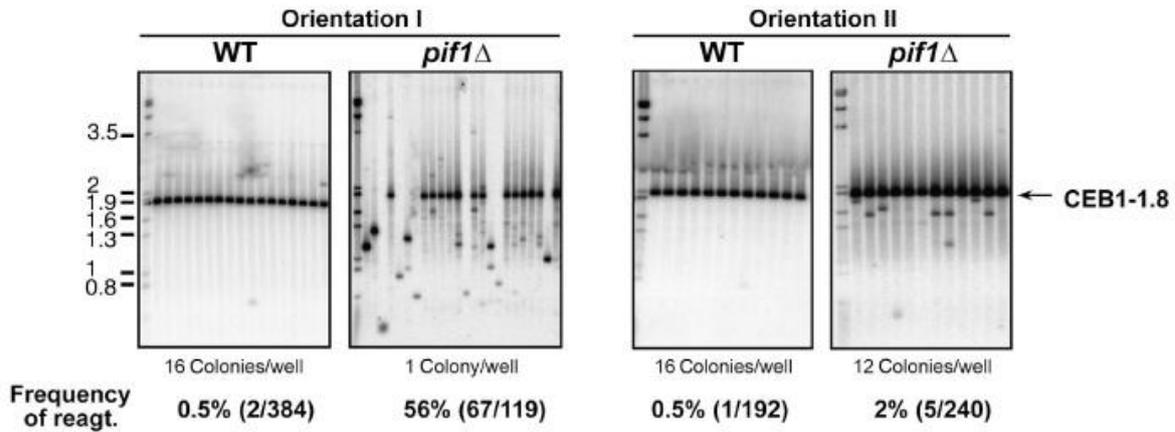


Figure 23 Instabilité du minisatellite en position leading dans les cellules *pif1*Δ. L'instabilité du minisatellite CEB1 en orientation I et II est mesurée dans des cellules sauvages et *pif1*Δ et visualisée par Southern blot grâce à une sonde radioactive CEB1 spécifique, et après digestion de l'ADN génomique par les enzymes *ApaI/XhoI* en orientation I et *ApaI/NcoI* en orientation II. Le nombre de colonies analysées par puit est indiquée.

Afin de confirmer que l'instabilité de CEB1 proche de l'ARS305 dépend bien de sa capacité à former des G-quadruplexes *in vivo*, les cellules ont été traitées avec un ligand des G-quadruplexes, Phen-DC3, capable d'inhiber le déroulement des G4 par Pif1 *in vitro*. Des cellules sauvages présentant le minisatellite dans chacune des deux orientations sont ainsi traitées avec ou sans Phen-C3. Les résultats révèlent un faible taux de réarrangements (0.5%) sans traitement alors que l'ajout du ligand Phen-C3 engendre 11.2% de réarrangements en orientation I contre seulement 4.1% en orientation II, suggérant que l'instabilité de CEB1 proche de l'ARS305 dépend bien de la formation de G4 *in vivo* stabilisés par Phen-C3.

La protéine Pif1-K264A se fixe sur l'ADN de façon similaire à la protéine sauvage mais son absence d'activité ATPase/hélicase facilite la détection de ses sites de fixation. Il a été montré récemment que Pif1-K264A est associée à 11% des sites G4 en fin de phase S. Son absence entraîne un ralentissement des fourches de réplication spécifiquement dans les régions proches des structures G4 sur lesquelles il se fixe habituellement (Paeschke et al. Zakian 2011).

2. Rôle de Pif1 dans la régulation de la télomérase

Le rôle de l'hélicase Pif1 en tant que régulateur négatif de la longueur des télomères a été mis en évidence pour la première fois en 1994, lors d'un crible visant à identifier des gènes affectant les télomères. En effet, un mutant de la forme nucléaire de Pif1 appelé *pif1-m2* entraîne un allongement de la longueur des télomères alors qu'un mutant de la forme

mitochondriale de Pif1, *pif1-m1*, est sans effet (Figure 24) (Schulz et Zakian 1994). Dans cette partie, nous allons voir en détail le rôle de Pif1 dans la régulation de la télomérase au niveau des télomères mais également au niveau de structures semblables telles que les cassures double-brins de l'ADN.

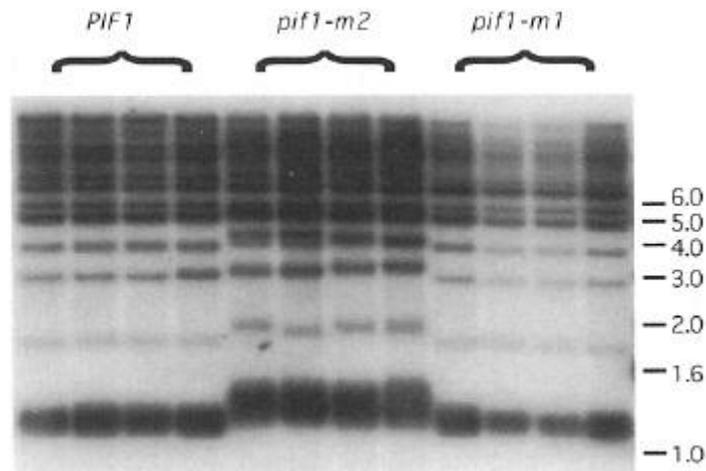


Figure 24 L'hélicase Pif1 régule négativement l'élongation des télomères. La mutation du premier codon initiateur appelé *m1* empêche la traduction de la forme mitochondriale de Pif1 alors que le deuxième codon *m2* empêche la traduction de la forme nucléaire de Pif1. L'analyse par Southern blot de la taille des télomères grâce à une sonde spécifique des répétitions télomériques montre que le mutant nucléaire *pif1-m2* entraîne un allongement de la taille des télomères alors que le mutant mitochondrial *pif1-m1* n'a aucun effet sur la taille des télomères (Schulz et Zakian 1994)

2.1. Pif1 limite la processivité de la télomérase aux télomères

L'absence de *PIF1* entraîne un allongement de la longueur des télomères d'environ 100 pb alors que sa surexpression diminue leur longueur d'environ 80 pb. Le mutant *pif1K264A* n'ayant plus d'activité ATPase/hélicase présente le même phénotype que le mutant *pif1Δ*, montrant que ce phénomène est bien dépendant de l'activité hélicase de Pif1. Il a été mis en évidence que l'allongement des télomères observé dans un mutant *pif1Δ* est dépendant de la télomérase. En effet la délétion de *PIF1* dans un mutant *tlc1Δ* n'a aucun effet sur la longueur des télomères. En revanche, cet effet est indépendant du processus de recombinaison (Zhou et al. 2000).

Nous avons vu précédemment que la processivité décrit la capacité d'une enzyme à réaliser des cycles de réactions multiples sans être décrochée de son substrat. Deux types de processivité ont été décrits pour la télomérase. Le premier repose sur la capacité de la télomérase à copier entièrement le substrat *TLC1* sans être dissociée de l'ADN. Le second repose sur sa capacité à transloquer l'ARN afin d'engager une seconde réplication sans être

dissociée de l'ADN (Lue 2004). L'activité préférentielle de Pif1 pour les hybrides ADN/ARN a amené l'hypothèse que Pif1 pourrait décrocher la télomérase du télomère. La processivité de la télomérase a été mesurée *in vitro* en présence et en absence de Pif1. Les résultats obtenus ont montré qu'en absence de Pif1, la télomérase initie des produits d'élongation d'environ 5 à 7 nt contre seulement 2 en présence de Pif1. De façon concordante, des expériences de co-immunoprécipitation de la chromatine ont mis en évidence que la surexpression de Pif1 sous le contrôle d'un promoteur galactose entraîne une diminution de deux fois de la quantité de Est2 associée au télomère comparé à des conditions sauvage, alors que la surexpression du mutant catalytique *pif1-K264A* n'a aucun effet sur la quantité de Est2 associée au télomère (Boule et al. 2005). Cette étude montre que Pif1 limite la processivité de la télomérase *in vitro* et favorise son décrochement des extrémités d'ADN à la fois *in vitro* et *in vivo*.

2.2. Pif1 inhibe le recrutement de la télomérase aux cassures double-brins de l'ADN

Afin de différencier les extrémités télomériques des cassures double-brins de l'ADN, la cellule met en place différentes stratégies. L'une d'elle est liée à la présence de protéines spécifiques du télomère qui forment un capuchon télomérique nécessaire à la fois pour la protection du télomère et pour le recrutement spécifique de la télomérase. De façon parallèle aux cassures double-brins de l'ADN, il existe des voies d'inhibition de la télomérase qui empêchent l'addition de télomères *de novo* favorisant ainsi la réparation grâce aux différentes voies de réparation de l'ADN, par HR ou NHEJ. L'hélicase Pif1 participe activement à cette inhibition de la télomérase. En effet, en plus de favoriser le décrochement de la télomérase du télomère, Pif1 est capable d'inhiber son recrutement au niveau de cassures double-brins de l'ADN afin de prévenir la formation de télomères *de novo*. Ainsi, un mutant *pif1-m2* présente un taux 600 fois plus élevé de Grand Réarrangements Chromosomiques (GCR) dont la majorité correspond à une addition de télomères *de novo*, alors qu'un mutant *pif1-m1* qui abolit la forme mitochondriale de Pif1 n'a aucun effet (Schulz et Zakian 1994). D'autres protéines telles que Est1, Est2, Cdc13 et l'hétérodimère KU contribuent à la voie d'addition de télomères *de novo*. En effet, un mutant *cdc13-2* diminue le taux de GCR d'un mutant *pif1-m2* jusqu'à un taux similaire à celui observé dans des cellules sauvages (Myung K. et al., 2001). Des observations similaires faites dans des mutants *est1Δ*, *est2Δ* ou encore *tlc1Δ* indiquent que l'addition de télomères *de novo* dans un mutant *pif1Δ* nécessite la présence de la télomérase. De la même façon, un mutant *yku80-135i* qui n'est plus capable d'interagir avec

l'ARN *TLC1* de la télomérase, présente une forte réduction de formation de télomères *de novo* après induction de dommage à l'ADN par ajout de méthyl méthane sulphonate (MMS) (Stellwagen et al. 2003) et la mutation de Ku70 ou Ku80 entraîne une diminution du taux de GCR des cellules *pif1-m2* (Banerjee et al. 2006).

Récemment, il a été proposé qu'une phosphorylation spécifique de Pif1 inhibe le recrutement de la télomérase au niveau des cassures double-brins de l'ADN (Makovets et Blackburn 2009).

2.3 Phosphorylation de Pif1 et signification fonctionnelle

L'inactivation de la signalisation des dommages à l'ADN dans certains mutants tels que *mec1Δ* ou *rad53Δ* entraîne une augmentation de l'addition de télomères *de novo* au niveau des cassures spontanées de l'ADN. En 2009, Makovets et Blackburn ont émis l'hypothèse selon laquelle Pif1 serait soumis à la régulation de la réponse aux dommages à l'ADN (Makovets et Blackburn 2009). Différents traitements, tels que la phléomycine (intercalant de l'ADN provoquant des cassures), l'hydroxyurée (provoquant l'arrêt des fourches de réplication) ou l'induction d'une cassure non réparable, entraînent une phosphorylation de la protéine Pif1 sur les résidus thréonine 763 et sérine 766 dépendante des protéines Mec1. Un traitement à la phosphatase dévoile un niveau basal de phosphorylation de Pif1, auquel vient s'ajouter une phosphorylation supplémentaire lors d'induction de dommage à l'ADN Rad53 (Makovets et Blackburn 2009).

Comme dans les mutants *mec1Δ*, *rad53Δ* ou encore *pif1Δ*, le mutant de phosphorylation *pif1-T763A/S766A* présente une augmentation de l'addition de télomères *de novo* aux cassures de l'ADN. Pif1 est recruté de façon indépendante à Rad53 au niveau d'une cassure de l'ADN induite (Makovets et Blackburn 2009). Le mutant de phosphorylation *pif1-T763A/S766A* est recruté à une cassure induite de façon similaire à la protéine sauvage. La phosphorylation de Pif1 n'est donc pas nécessaire à son recrutement au niveau des cassures de l'ADN.

Alors que la phosphorylation de Pif1 est nécessaire à l'inhibition de la formation de télomères *de novo* aux cassures de l'ADN, elle n'a en revanche aucun effet sur la longueur des télomères puisque le mutant *pif1-T763A/S766A* présente des télomères de taille similaire à celle observée dans des cellules sauvages.

En résumé, l'induction de dommages à l'ADN entraînerait la phosphorylation de Pif1 de façon dépendante à Mec1 et Rad53. Cette phosphorylation, nécessaire à l'inhibition de la

téломérase au niveau des cassures de l'ADN, préviendrait ainsi la formation de télomères *de novo* afin de favoriser les systèmes de réparation par HR ou NHEJ selon le modèle présenté dans la Figure 25.

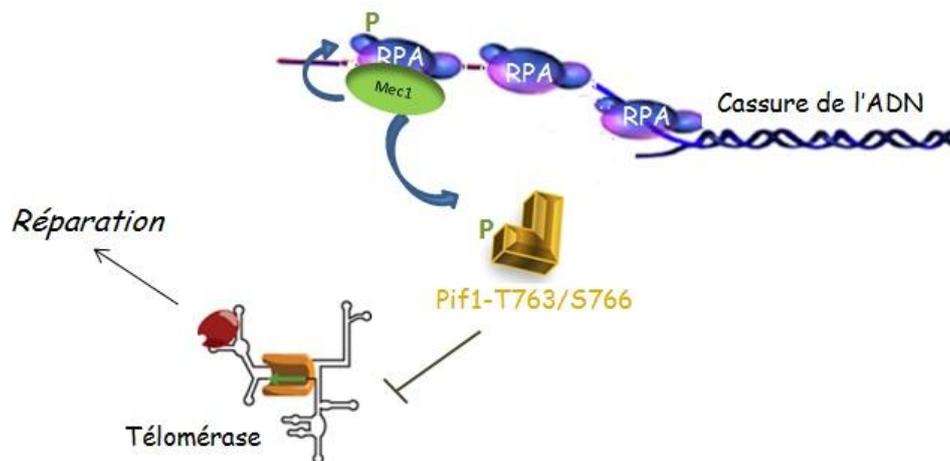


Figure 25 Modèle proposant l'inhibition de la télomérase par Pif1. La formation d'une cassure double-brins de l'ADN entraîne après un processus de résection du brin 5', le recrutement de la protéine RPA sur l'ADN simple-brin 3' sortant. Des expériences de ChIP ont mis en évidence que l'hélicase Pif1 était également recrutée sur une cassure double-brins induite. La fixation de RPA entraîne le recrutement de la kinase Mec1 qui va à la fois phosphoryler RPA et Pif1. La forme phosphorylée de Pif1 empêche la formation de télomères *de novo* via une inhibition de la télomérase au niveau de la cassure, et favorisant ainsi les processus de réparation par RH ou NHEJ.

3. La télomérase "Gain de fonction"

3.1. Présentation de la mutation *est2-up34* gain de fonction

Décrite précédemment, la protéine Est2 possède une structure dite en "main droite" dont les domaines "paume" et "doigts" contiennent le site catalytique de l'enzyme tandis que le "pouce" serait formé par le domaine C-terminal (Gillis, Schuller, et Skordalakes 2008). Un crible visant à identifier des mutations dans *EST2* provoquant une sur-élongation des télomères a permis d'isoler et de caractériser quatre mutants appelés *est2-up2(I441M)*, *est2-up34(D460N)*, *est2-up65(E463G)* et *est2-up67(L430S)* (Figure 26). Ces derniers présentent chacun une mutation ponctuelle localisée dans un domaine très conservé de 33 nt, peu caractérisé, dans la région des "doigts". Un test *in vitro* visant à évaluer l'activité de la télomérase montre un léger défaut des mutants *est2-up* dans la capacité à ajouter des nucléotides comparé aux cellules sauvages alors que les fréquences de pauses ne sont quant à elles pas altérées (Eugster et al. 2006).

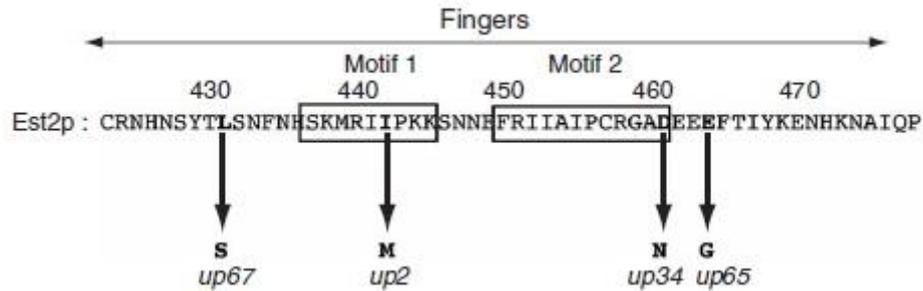


Figure 26 Localisation des mutations "up" dans une région très conservée du domaine "doigt". Chaque mutant présente une mutation ponctuelle à l'origine du remplacement d'un acide aminé: *est2-up2*(I441M), *est2-up34*(D460N), *est2-up65*(E463G) et *est2-up67*(L430S) (Eugster et al. 2006).

La mutation *est2-up34* présente le phénotype le plus marqué avec un rallongement de la longueur des télomères de plus de 100 nt. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine à partir de cellules synchronisées ont mis en évidence une augmentation de l'association de Est1 aux extrémités télomériques durant la phase S dans un mutant *est2-up34* comparé à des cellules sauvages. La mutation *est2-up34* entraîne systématiquement l'allongement de la longueur des télomères chez 36 mutants connus eux-mêmes soit pour rallonger soit pour raccourcir les télomères (incluant *tell1Δ*, *rif1Δ*, *rif2Δ* ou *rrm3Δ*). Seule l'hélicase Pif1 semble être résistante à l'effet de la mutation *est2-up34* (Eugster et al. 2006).

3.2. Interaction génétique entre les protéines Pif1 et *Est2-up34*

Une étude de la longueur des télomères a montré que la mutation *est2-up34* non seulement n'entraîne pas d'élongation des télomères mais provoque un léger raccourcissement dans un mutant *pif1Δ*. Cette relation d'épistasie est conservée dans le mutant catalytique *pif1-K264A* ainsi que dans le mutant *pif1-m2* dans lequel la forme nucléaire de Pif1 est mutée. En revanche, la mutation *est2-up34* entraîne une élongation des télomères dans le mutant mitochondrial *pif1-m1*, montrant que cette relation d'épistasie est spécifique de la forme nucléaire de Pif1 (Eugster et al. 2006).

En absence de Pif1, le taux de GCR augmente fortement (Schulz et Zakian 1994). Dans des travaux non publiés, l'équipe d'Eric Gilson a mesuré une augmentation du taux de GCR, d'un facteur 100 dans un mutant *est2-up34* contre un facteur 1000 dans un mutant *pif1Δ*. Le double mutant *pif1Δ est2-up34* présente un taux similaire à celui observé dans un mutant *pif1Δ*. La nature des événements GCR identifiés est dans 60% des cas la formation de télomères *de novo* dans le mutant *est2-up34* contre 80% pour les mutants *pif1Δ* et *pif1Δ est2-*

up34 (Figure 27). La différence observée entre les mutants *est2-up34* et *pif1Δ est2-up34* indique que soit la télomérase "up" ne présente qu'une résistance partielle à Pif1, soit son activité réduite d'élongation décrite précédemment diminue la fréquence d'addition de télomères *de novo* aux cassures comparé aux cellules *pif1Δ*. De plus, ces résultats suggèrent que le domaine des doigts de la télomérase participe au maintien de l'intégrité du génome en inhibant l'ajout de télomères *de novo* sur des sites non télomériques.

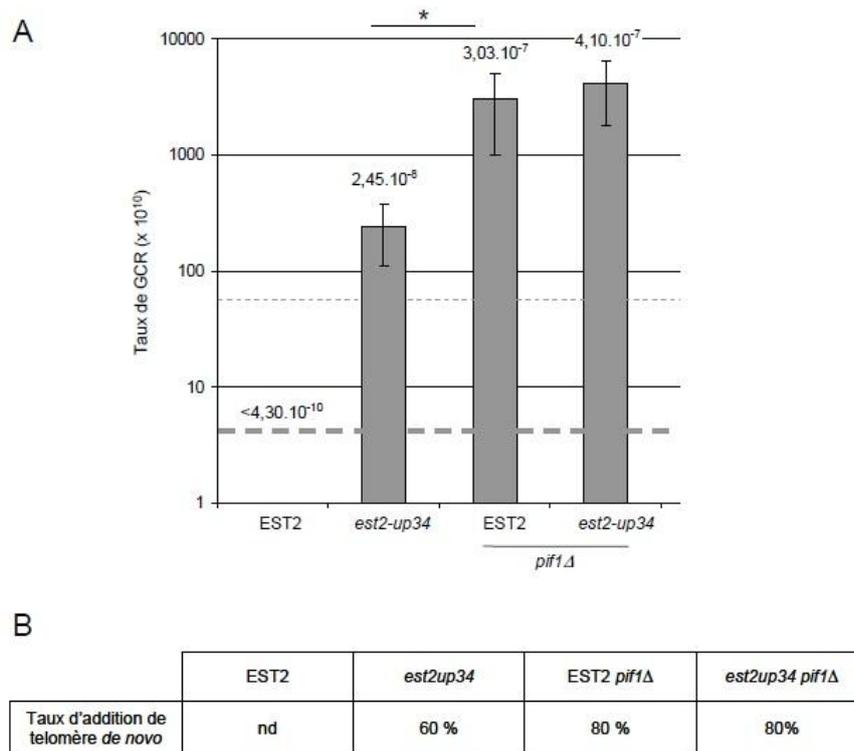


Figure 27 Augmentation de la formation de télomères *de novo* dans le mutant *est2-up34* comparé au sauvage. (A) Les valeurs indiquées représentant le taux de GCR correspondent à la moyenne obtenue à partir de 8 à 15 cultures indépendantes. Il correspond au nombre de cellules poussant sur milieu SD+5-FoA+canavanine rapporté au nombre de cellules poussant sur YPD (cf. méthode Chen & Kolodner, 1999) (B) La mesure du taux d'addition de télomère *de novo* est réalisée par PCR pour la présence de télomère sur le point de cassure (Bonneton & Gilson, non publié).

3.3 Interaction physique entre Pif1 et l'ARN *TLC1* de la télomérase *Est2-up34*

L'immunoprécipitation de Pif1 suivi d'une RT-PCR a permis de mettre en évidence une interaction entre la protéine Pif1 et l'ARN *TLC1* de la télomérase dans un contexte *est2-up34*, alors que cette interaction est difficilement détectable dans un contexte sauvage (Eugster *at al.*, 2006). L'interaction Pif1/*TLC1* reflète une interaction entre Pif1 et la télomérase. La mutation *est2-up34* pourrait donc stabiliser une interaction trop brève pour être détectée dans les cellules sauvages. De plus l'équipe d'Eric Gilson a montré que l'interaction

Pif1/*TLC1* est conservée dans le mutant catalytique *pif1-K264A*, ce qui suggère que l'hélicase Pif1 n'a pas besoin d'être active pour interagir avec l'ARN *TLC1* (*travaux non publiés*). Le fait que cette interaction ne soit toujours pas détectable en contexte sauvage dans un mutant *pif1-K264A* montre que l'interaction Pif1/*TLC1* détectée en contexte *est2-up34* n'est pas seulement due au fait que Pif1 ne soit pas capable de dissocier la *téломérase up* du télomère. La mutation *est2-up34* pourrait entraîner un changement de conformation et ainsi une "séquestration" de Pif1.

L'utilisation de deux formes mutées de *TLC1*, l'une n'interagissant plus avec Est1 (*tlc1^{Δ517-707}*) et l'autre avec Est2 (*tlc1^{Δ708-864}*), a montré que l'interaction Pif1/*TLC1* était conservée lorsque *TLC1* n'interagissait plus avec Est1 mais qu'en revanche elle était abolie lorsque l'interaction Est2/*TLC1* était perdue. Ceci suggère soit que l'interaction de Pif1 avec *TLC1* nécessite au préalable l'assemblage du "core" télomérique. Afin de mieux caractériser cette interaction, des expériences de coimmunoprécipitation ont été réalisées dans des mutants *est1Δ*, *est3Δ* ainsi que dans le mutant catalytique de la télomérase (*est2-D530A*) en contexte *up*. La délétion de *EST1* ainsi que celle de *EST3* n'a aucun effet sur l'interaction PIF1/*TLC1* détectée en contexte *est2-up34*. Ces deux mutations abolissant l'activité de la télomérase *in vivo*, celle-ci n'est donc pas nécessaire à l'interaction. L'inactivation du site catalytique de *EST2* chez le mutant *est2up34* entraîne une perte de l'interaction Pif1/*TLC1*. La conformation structurale de Est2 montre que le domaine des doigts dans lequel est localisé la mutation *est2-up34* se trouve juste en face du site catalytique de l'enzyme. La combinaison des mutations *est2-D530A* et *est2-up34* pourrait entraîner une déstructuration de Est2 qui empêcherait l'association de Pif1 avec la télomérase.

Deux études indépendantes ont montré, que l'hélicase Pif1 et la protéine Est2 sont recrutées au niveau d'une cassure double-brins induite (Wagner et al. 2006); (Oza et al. 2009). L'équipe d'Eric Gilson a donc étudié la formation du complexe Pif1/*TLC1* après induction de dommage à l'ADN par traitement MMS. L'interaction Pif1/*TLC1* semble diminuer dans le lysat cellulaire qui ne contient que les complexes extraits de la chromatine. Un traitement de l'échantillon à la DNaseI permet de libérer les complexes fixés sur la chromatine et révèle alors une forte augmentation du signal d'interaction Pif1/*TLC1* dans un contexte *est2-up34*. Il semblerait que l'induction de dommage à l'ADN entraîne non seulement une augmentation du nombre de complexes Pif1/*TLC1* mais qu'en plus ces complexes soient adressés à l'ADN (*Figure 28*).

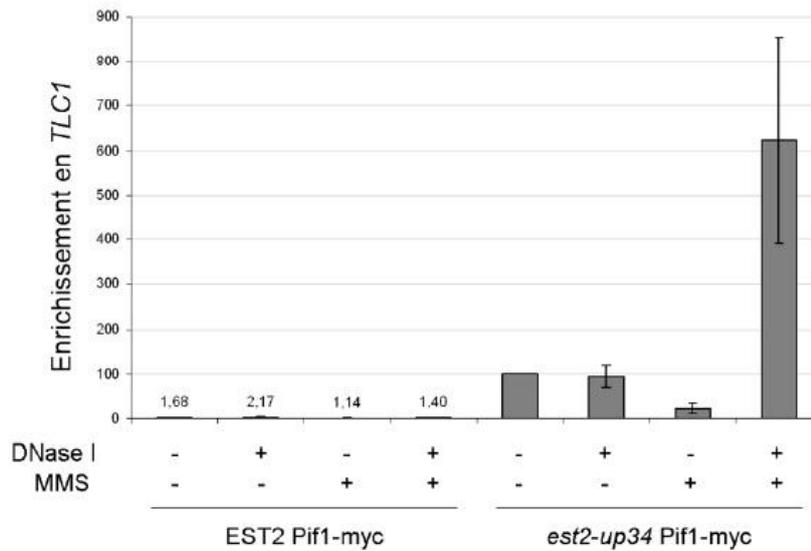


Figure 28 L'interaction Pif1/TLC1 est dépendante des dommages à l'ADN. Une interaction entre Pif1 et l'ARN TLC1 est détectée dans un mutant *est2-up34* en présence ou non de DNaseI. Le complexe est adressé à l'ADN lors de l'ajout de MMS. L'enrichissement en TLC1 est évalué par PCR quantitative et correspond à la quantité de TLC1 détectée dans l'immunoprécipitat rapporté à la quantité d'ARN messenger de ACT1. La valeur obtenue dans le mutant *est2-up34* est fixée arbitrairement à 100 (Bonneton et Gilson, non publié).

Objectif de l'étude

De nombreuses études ont montré que la protéine affine du simple-brin RPA initie le recrutement de protéines de surveillance des dommages à l'ADN et de réparation de l'ADN au niveau des cassures double-brins de l'ADN (CDB). L'apparition d'une CDB s'accompagne du recrutement précoce du complexe MRX (Mre11/Rad50/Xrs2). Les extrémités de la cassure sont soumises à dégradation exonucléasique de 5' vers 3', un processus appelé «résection». Le simple-brin engendré est reconnu par RPA qui interagit à son tour avec la kinase Mec1 (ATR) capable de phosphoryler l'hélicase Pif1.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, en plus de son rôle pour décrocher la télomérase des télomères des études récentes ont montré que Pif1 joue un rôle clé dans la stabilité du génome *via* l'inhibition de la formation de télomères *de novo* au niveau des cassures de l'ADN ainsi que dans la réplication des structures particulières de l'ADN telles que les G-quadruplexes. Au cours de mon travail de thèse, j'ai mis en évidence une interaction robuste entre Pif1 et RPA, RPA jouant elle-même un rôle clé au cours de la réplication ainsi qu'au niveau des CDB. J'ai alors cherché à déterminer les relations fonctionnelles entre ces deux protéines. Plus précisément, j'ai cherché à comprendre le rôle de l'interaction Pif1/RPA dans les processus de reconnaissance des cassures de l'ADN, la réplication et la régulation de la taille des télomères. Mes travaux se sont déroulés en plusieurs étapes:

- ✓ Mise en évidence de l'interaction Pif1/RPA
- ✓ Identification d'un mutant de RPA altérant l'interaction avec Pif1;
- ✓ Etude du recrutement de Pif1 aux CDB dans différents contextes;
- ✓ Caractérisation de l'interaction Pif1/RPA et étude de son rôle dans la réparation des CDB, la réplication et la régulation de la taille des télomères.

Chapitre 2:

Résultats

I. Mise en évidence d'une interaction entre l'hélicase Pif1 et la protéine de réplication RPA

1. L'interaction Pif1/RPA

L'hélicase Pif1 et la protéine de réplication RPA, sont toutes deux présentes au cours de divers processus cellulaires et moléculaires tels que la réplication de l'ADN, la réplication des télomères ou encore la réparation des cassures double-brins de l'ADN. Nous nous sommes donc posé la question d'une éventuelle interaction entre ces deux protéines.

L'hétérotrimère RPA est composé des sous-unités Rfa1, Rfa2 et Rfa3 de poids moléculaire 70, 30 et 14 kDa respectivement. Afin de tester une interaction Pif1/RPA, j'ai réalisé une IP de la protéine Pif1-myc puis révélé l'immunoprécipitat avec des anticorps polyclonaux dirigés contre les sous-unités Rfa1 et Rfa2. Les résultats obtenus montrent une interaction robuste entre Pif1 et l'hétérotrimère RPA (*Figure 29*). Afin de déterminer si cette interaction est dépendante de l'ADN, j'ai traité les échantillons avec ou sans DNase. Les résultats obtenus confirment une interaction directe entre les deux protéines, indépendante de l'ADN (*Figure 29*).

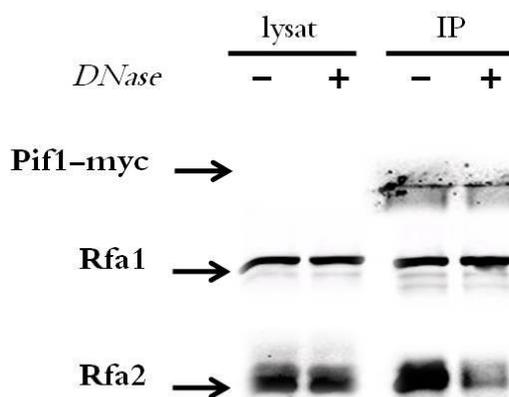


Figure 29 Interaction Pif1/RPA. Les protéines Rfa1 et Rfa2 co-immunoprécipitées avec Pif1myc révèlent une interaction robuste entre l'hélicase et le complexe hétérotrimérique. L'IP a été réalisée avec l'anticorps monoclonal anti-myc (9E10) de chez Santa Cruz Biotechnology. Les protéines Rfa1 et Rfa2 ont été révélées avec des anticorps polyclonaux anti-Rfa1 et anti-Rfa2 cordialement fournis par Steve Brill.

Afin d'analyser cette interaction au cours du cycle cellulaire, les cellules ont été synchronisées en phase G1 par ajout d'alpha facteur et des prélèvements ont été réalisés toutes

les 15 minutes après la relâche des cellules dans le cycle cellulaire. L'analyse en cytométrie de flux montre une entrée des cellules en phase S dès 30 minutes après la relâche des cellules (Figure 30A).

Comme cela a été décrit 2007 par Vega et ses collaborateurs (Vega et al. 2007), nous pouvons observer une régulation de l'expression de Pif1 au cours du cycle cellulaire avec un taux maximum d'expression en fin de phase S. La Figure 30B ci-dessous, montre que l'interaction Pif1/RPA augmente à 45 par rapport à 30 min alors que la quantité de Pif1 est similaire. L'interaction RPA/Pif1 est maximale en phase S et se maintient ensuite en G2 (Figure 30B).

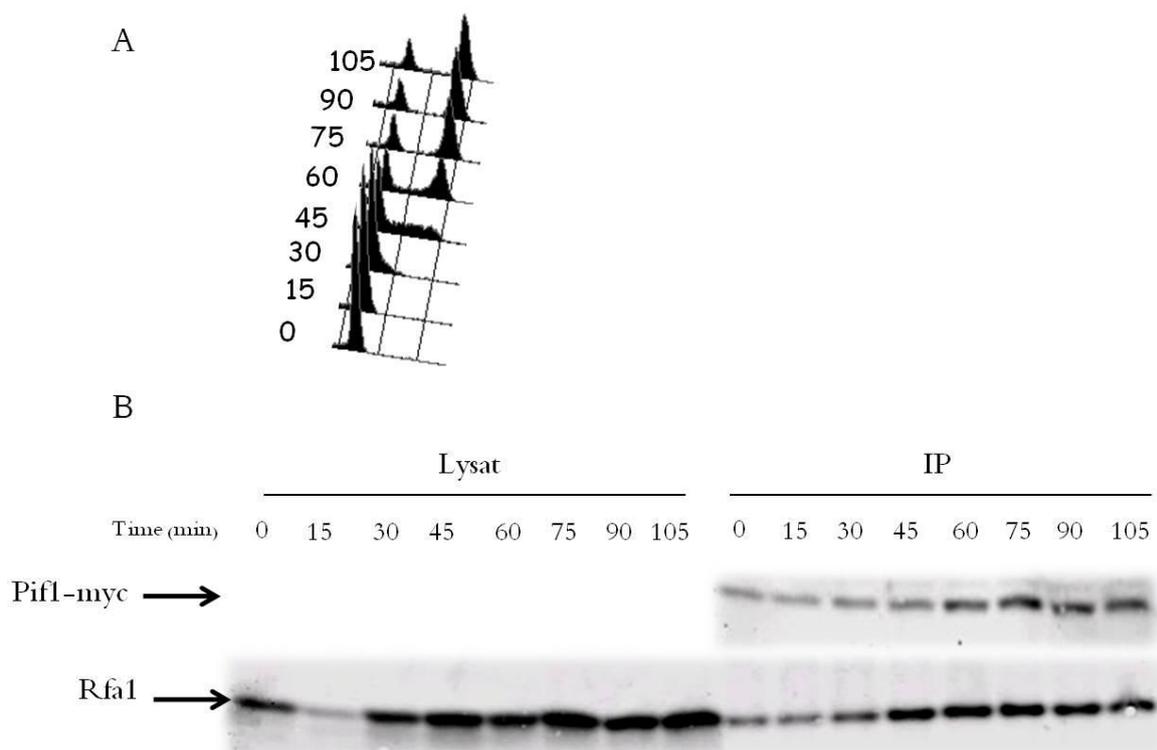


Figure 30 L'interaction Pif1/RPA augmente durant la phase S du cycle cellulaire. (A) Analyse du cycle cellulaire de la souche *Pif1myc* par cytométrie de flux. Des cellules *Pif1myc MATa barΔ-* ont été synchronisées en phase G1 par 100ng/ml d'alpha-facteur pendant 2h à 30°C puis relâchées de façon synchrone dans un nouveau cycle cellulaire. (B) Immunoprécipitation de la protéine *Pif1myc* au cours du cycle cellulaire avec l'anticorps monoclonal anti-myc (9E10) de chez Santa Cruz Biotechnology. La protéine *Rfa1* co-immunoprécipitée a été révélée avec un anticorps polyclonal anti-*Rfa1*. La protéine *Pif1myc*, peu abondante, n'est pas détectée dans le lysat (4% du matériel total) mais uniquement dans l'IP.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats met en évidence une interaction robuste entre Pif1 et RPA qui est indépendante de l'ADN et maximale en phase S.

De façon intéressante, cette interaction semble conservée puisqu'une étude non publiée, réalisée dans le laboratoire de Virginia Zakian, a mis en évidence par des expériences double-hybrides une interaction entre l'hélicase Pfh1, homologue de Pif1 chez *S. pombe* et l'hétérotrimère RPA.

2. L'interaction Pif1/RPA dans les mutants *rfa1-D228Y* et *rfa1-t11*

Afin de comprendre le rôle de cette interaction, nous avons utilisé deux mutants de la grande sous-unité Rfa1 de l'hétérotrimère RPA.

En 1995, Smith et Rothstein ont identifiés un allèle de *RFA1* qui supprime le défaut de recombinaison d'un double mutant *rad1Δ rad52Δ*. Ils étudièrent alors les mécanismes par lesquels le mutant *rfa1-D228Y*, est capable d'augmenter la recombinaison. Rfa1-D228Y se liant moins bien à l'ADN simple-brin faciliterait l'accès d'endo- ou exonucléase diminuant ainsi les intermédiaires d'ADN simple-brin caractéristiques d'un mutant *rad52Δ* (Smith et Rothstein 1995). Le mutant *rfa1-D228Y* présente également un léger défaut de réplication avec un retard de l'entrée des cellules en phase S, une sensibilité aux UV ainsi qu'un défaut de recombinaison hétéro-allélique. L'analyse de la séquence de *RFA1* révèle que la mutation de l'acide aspartique 228 en tyrosine altère un résidu très conservé de la protéine. De plus, des travaux en cours de publication menés au laboratoire (Luciano et al. Embo J.), ont montré que RPA se fixe aux télomères et interagit avec la télomérase par l'intermédiaire des protéines yKu et Est1 en fin de phase S et que l'interaction de Rfa1-D228Y aux télomères ainsi qu'avec la télomérase est affectée. Un effet de la mutation *rfa1-D228Y* sur la longueur des télomères n'est visible que dans des conditions où la télomérase n'est plus réprimée tel que dans les mutants *rif1Δ* et *rif2Δ*. Chez *S. pombe*, la mutation *rfa1-D223Y* affecte également l'interaction de la télomérase avec RPA et entraîne une réduction nette de la taille des télomères (Luciano et al. Embo J.).

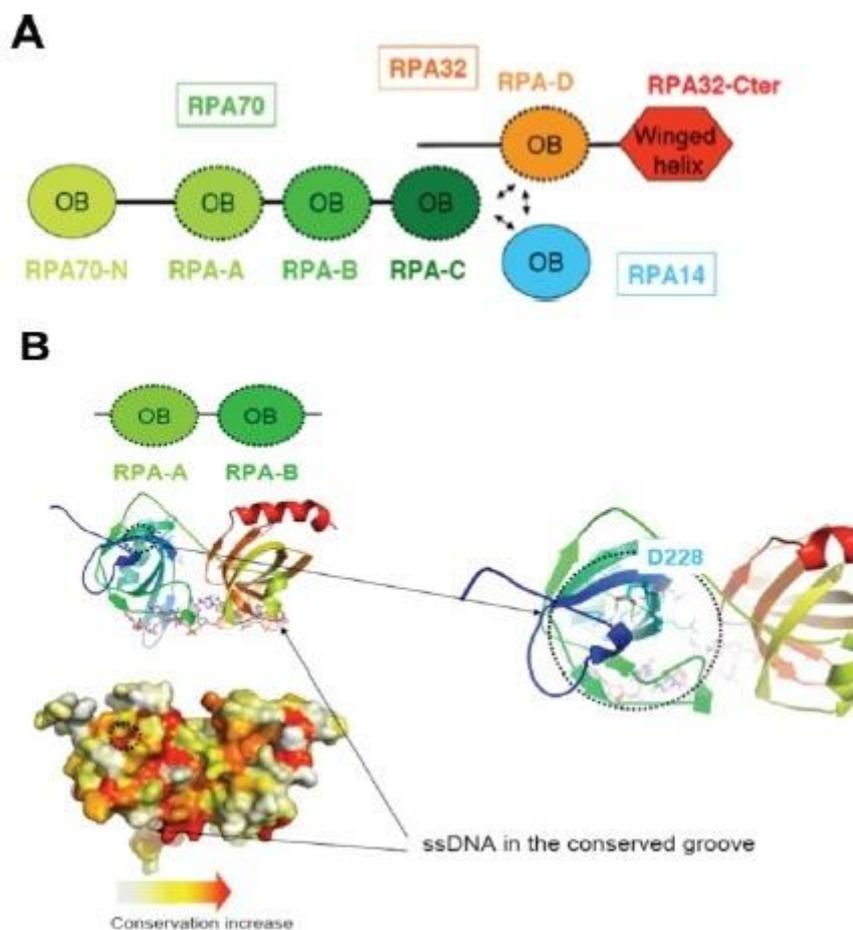


Figure 31 Localisation de la mutation *rfa1-D228Y*. (A) Organisation de l'hétérotrimère RPA70/RPA32/RPA14. L'association de RPA avec l'ADN *sb* est principalement médiée par les domaines OB (Oligonucléotide/oligosaccharide Binding) A, B et C de RPA70, et le domaine OB D de RPA32. (B) Localisation de la mutation *rfa1-D228Y* à partir de la structure des domaines OB RPA-A/RPA-B de l'homme. L'acide aspartique en position 228 est conservé lors de l'alignement des protéines RPA70. En accord avec la structure de Rfa1 publiée (Bochkareva et al. 2001), ce résidu joue un rôle structural à la périphérie du second domaine OB de Rfa1, plus précisément au niveau de la première hélice du domaine OB-B. Le résidu D228 semble n'être pas directement accessible à la surface de la protéine, cependant sa mutation en tyrosine déstabiliserait localement la surface de la région conservée. Cette région conservée, différente de la région OB impliquée dans la liaison à l'ADN *sb* pourrait être impliquée dans une interaction avec d'autres partenaires que l'ADN *sb*.

L'allèle de *RFA1*, *rfa1-t11* présente des défauts de recombinaison méiotique, de commutation des locus de type sexuel ainsi qu'une sensibilité aux UV et MMS (Kantake et al. 2003). En 2007, Grandin et Charbonneau ont décrit également un défaut du mutant *rfa1-t11* dans le recrutement du complexe Mec1-Ddc2 sur une CDB, ainsi que dans la formation des deux types de recombinants télomériques. Alors, que la fusion Rfa1-t11-Ddc2 restaure l'arrêt du cycle cellulaire après un dommage de l'ADN, le défaut de formation des recombinants télomériques persiste (Grandin et Charbonneau 2007).

L'interaction de ces deux mutants, avec l'hélicase Pif1 a été mesurée comme précédemment par co-immunoprécipitation et Western blot. Les résultats obtenus indiquent que l'interaction du mutant *rfa1-D228Y* avec Pif1 est fortement altérée (Figure 32A). En effet, la quantification de l'interaction grâce au logiciel *ImageJ* indique que l'interaction Pif1/*Rfa1-D228Y* est 5 fois plus faible que celle observée dans des conditions sauvages (Figure 32B). La mutation *rfa1-t11* n'a quant à elle aucun effet sur l'interaction Pif1/RPA.

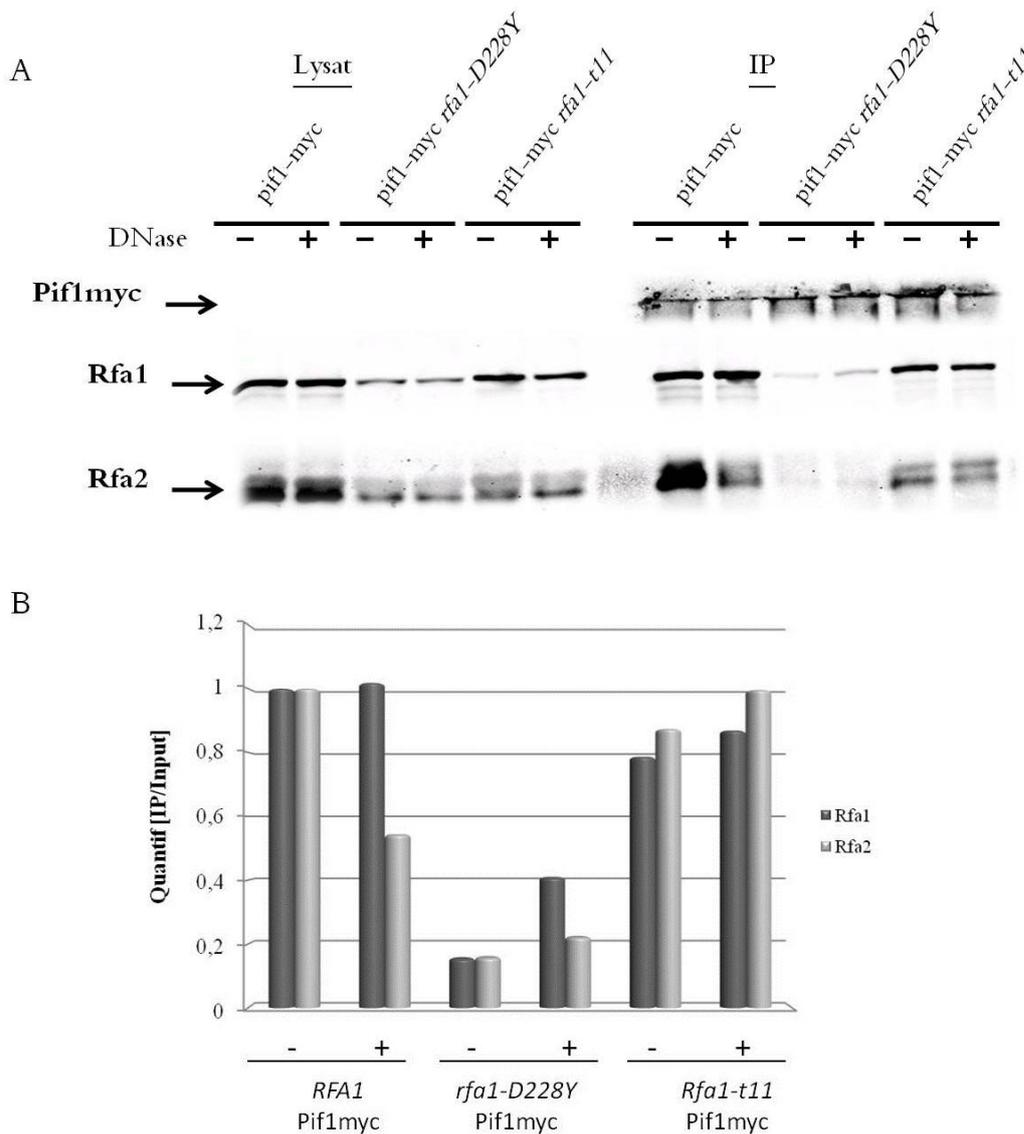


Figure 32 La mutation *rfa1-D228Y* affecte l'interaction Pif1/RPA. (A) L'immunoprécipitation de la protéine Pif1myc révèle un défaut d'interaction du mutant *rfa1-D228Y* avec l'hélicase. (B) La quantification des différentes interactions grâce au logiciel *ImageJ* montre que l'interaction Rfa1-D228Y/Pif1 est 5 fois plus faible que dans une souche sauvage alors que la mutation *rfa1-t11* n'a quant à elle aucun effet.

L'identification du défaut d'interaction avec Pif1 du mutant *rfa1-D228Y* constitue un outil de choix pour l'étude du rôle de l'interaction Pif1/RPA dans divers processus tels que la signalisation des cassures de l'ADN, la régulation de la taille des télomères ainsi que la réplication, processus impliquant à la fois l'hélicase Pif1 et l'hétérotrimère RPA.

3. L'interaction Pif1/RPA n'est pas nécessaire à la phosphorylation de Pif1 par Mec1 après induction de dommages à l'ADN.

La voie de recombinaison homologue très utilisée par la levure, se sert de la chromatide sœur pour réparer la cassure, et implique notamment une résection des extrémités de l'ADN. L'étape de résection crée une extrémité d'ADN simple-brin sur laquelle RPA va se fixer, permettant à son tour le recrutement de Rad52 et de la kinase Mec1 qui va phosphoryler à la fois la sous-unité Rfa1 sur la sérine 178 ainsi que l'hélicase Pif1 sur les résidus thréonine 763 et sérine 766 (Kim et Brill 2003) (Makovets et Blackburn 2009).

Nous nous sommes demandé si l'interaction Pif1/RPA était nécessaire à la phosphorylation de Pif1 par la kinase Mec1. Afin de répondre à cette question, nous avons étudié la phosphorylation de Pif1 après l'induction de dommages à l'ADN dans le mutant *rfa1-D228Y*. L'induction de dommage à l'ADN par ajout de HU provoquant un arrêt des fourches de réplication, n'est pas suffisant à induire la phosphorylation de Pif1 par Mec1. En revanche, l'ajout de MMS, agent alkylant ou de Phléomycine, intercalant de l'ADN engendre la phosphorylation de Pif1.

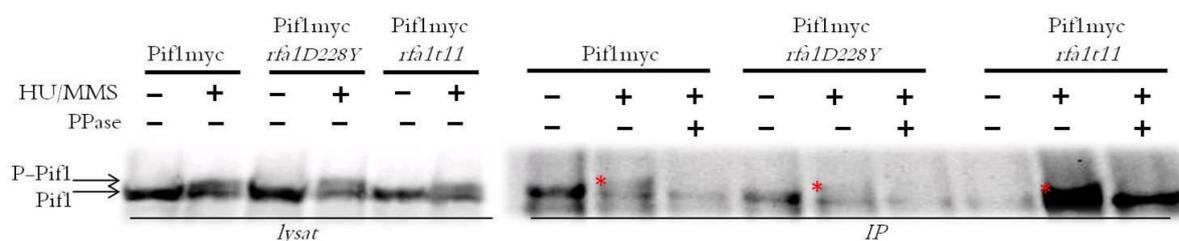


Figure 33 La perte d'interaction de Rfa1-D228Y avec Pif1 n'affecte pas la phosphorylation de Pif1 dépendante de Mec1. L'immunoprécipitation de Pif1myc après traitement au HU/MMS entraîne la phosphorylation de Pif1myc. La phosphorylation de Pif1 (astérisque rouge) n'est pas affectée dans les cellules *rfa1-D228Y* malgré le défaut d'interaction du mutant *Rfa1-D228Y* avec Pif1.

Les résultats obtenus montrent que la phosphorylation de Pif1 n'est affectée ni dans un mutant *rfa1-D228Y*, ni dans un mutant *rfa1-t11* (Figure 33).

Ceci indique que l'interaction Pif1/RPA ne semble pas nécessaire à la phosphorylation de Pif1 par Mec1. On ne peut cependant pas exclure que l'interaction Pif1/RPA résiduelle dans les cellules *rfa1-D228Y* soit suffisante à la phosphorylation de Pif1 par Mec1.

II L'interaction Pif1/RPA est impliquée dans le recrutement de Pif1 sur une cassure double-brin de l'ADN.

1. Le recrutement de Pif1 à une cassure HO est affecté dans le mutant *rfa1-D228Y*.

Lee et ses collaborateurs développèrent une souche dans laquelle une cassure double-brins de l'ADN peut être créée de façon artificielle (Lee et al. 1998). Cette souche, appelée JKM179 contient le gène codant pour l'endonucléase HO sous le contrôle d'un promoteur inducible GAL10. Le site de coupure HO spécifique à l'enzyme est localisé au niveau du locus *MAT*. Les séquences des deux donneurs potentiels *HML* et *HMR* étant délétées, la cassure HO générée ne peut être réparée par recombinaison homologue. Cette souche permet d'étudier de façon contrôlée le recrutement de protéines au niveau d'une cassure double-brins d'ADN par la technique de ChIP. Makovets et Blackburn ont mis en évidence le recrutement de Pif1 sur une cassure HO induite qui est indépendant de la phosphorylation de Pif1 (Makovets et Blackburn 2009).

Afin de déterminer si le recrutement de Pif1 est dépendant de son interaction avec RPA, j'ai mesuré sa fixation à une cassure HO dans le mutant *rfa1-D228Y*. J'ai pour cela utilisé le système d'induction d'une cassure HO par ajout de galactose décrit précédemment et mesuré le recrutement de Pif1 après 1h, 2h et 3h dans différents contextes cellulaires. J'ai dans un premier temps analysé la cinétique de coupure de l'endonucléase HO au cours du temps par Southern blot. Les résultats obtenus montrent une coupure maximale du site *MAT* dès 1 heure après l'induction de l'endonucléase HO (*Figure 34B*). Les résultats obtenus par ChIP montrent que la présence de la mutation *rfa1-D228Y* entraîne une diminution d'un facteur 4 du recrutement de Pif1 au niveau d'une cassure induite de l'ADN (*Figure 34C*).

Ces résultats montrent un rôle de l'interaction Pif1/RPA dans le recrutement de l'hélicase au niveau d'une cassure de l'ADN induite. Cette interaction pourrait ainsi contribuer à l'inhibition de la télomérase aux cassures de l'ADN.

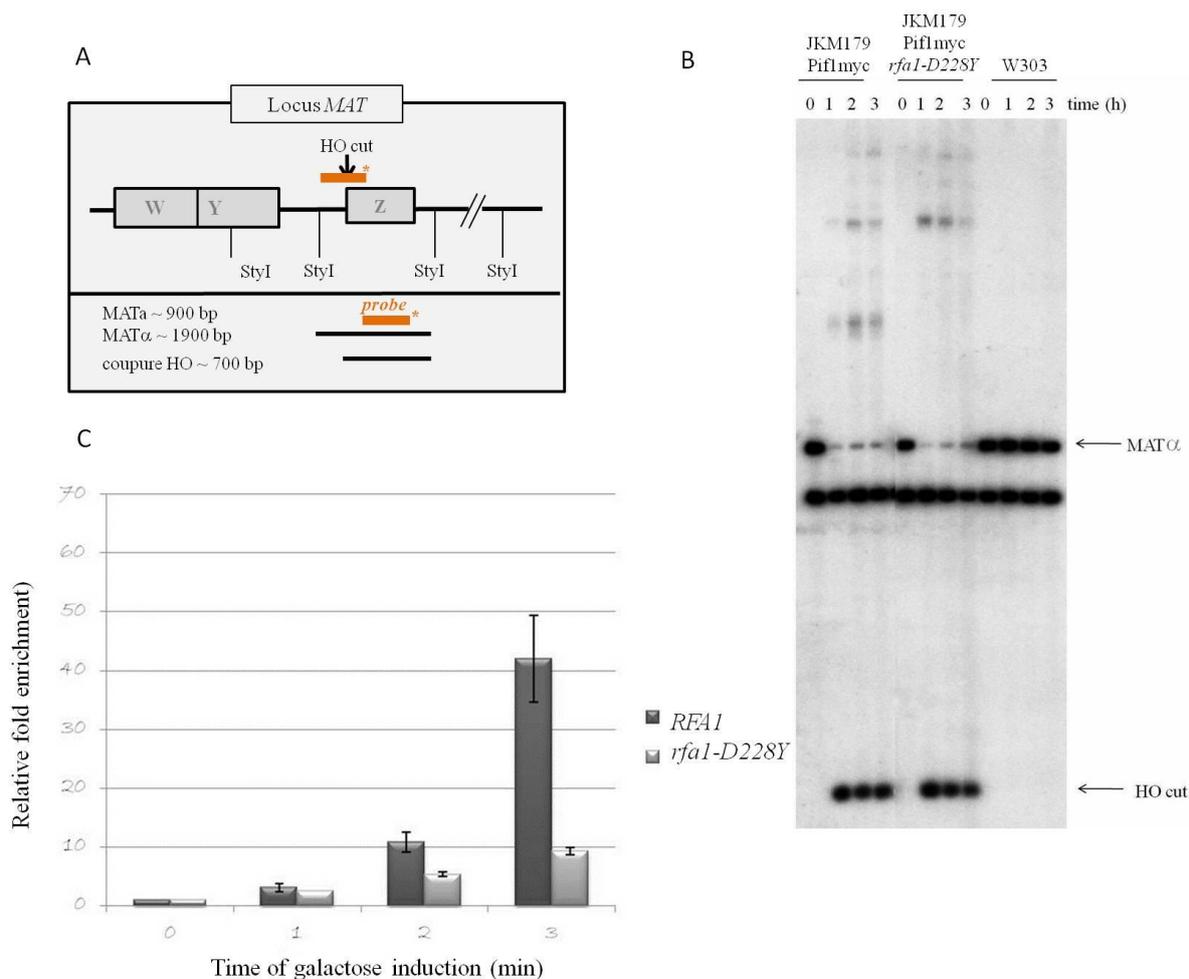


Figure 34 Défaut de recrutement de l'hélicase Pif1 aux cassures HO dans le mutant *rfa1-D228Y*. (A) Représentation schématique du locus *MAT* et des sites de restriction *StyI* entraînant un fragment de 1900 pb. Ce fragment est réduit à 700 pb après coupure HO. La sonde utilisée est en position distale à la coupure.. (B) Efficacité de coupure par l'endonucléase HO. Les différentes pistes correspondent aux prélèvements effectués 0, 1h, 2h et 3h après addition de Galactose. L'ADN génomique a été digéré par l'enzyme de restriction *StyI* et marqué par une sonde dCTP- $\alpha^{32}P$ distale décrite par Wang et Haber (H. Wang et al. 2001). Le produit de coupure HO d'environ 700 pb est observable dès 1h après l'ajout de galactose (C) Analyse du recrutement de *Pif1myc* par qPCR. Le recrutement de *Pif1* a été analysé par qPCR avec des oligonucléotides *MAT* spécifiques du site de coupure. Les résultats sont exprimés par le ratio $[(IP/Input)MatY]/[(IP/Input)Gal2]$. La valeur obtenue au temps 0 est fixée arbitrairement à 1 pour toutes les souches.

2. Le recrutement de Pif1 est augmenté en contexte télomérase "up" indépendamment de la mutation *rfa1-D228Y*.

Oza et ses collaborateurs ont mis en évidence le recrutement de la sous-unité catalytique de la télomérase Est2 au niveau d'une cassure induite (Oza et al. 2009). L'équipe d'Eric Gilson confirme ce résultat et montre que la protéine mutée Est2-up34 est recrutée plus fortement que la télomérase sauvage (*données non publiées*). Ces résultats et les liens entre la

télomérase et Pif1, nous ont poussé à étudier en collaboration avec l'équipe d'Eric Gilson le recrutement de Pif1 en contexte télomérase "up" sur la cassure HO.

Nous avons pour cela utilisé le système d'induction d'une cassure HO par ajout de galactose décrit précédemment et mesuré le recrutement de Pif1 après 1h, 2h et 3h dans différents contextes cellulaires. Par des expériences de CHIP, j'ai analysé le recrutement de Pif1 sur la cassure HO dans des souches délétées pour EST2 et complémentées par un plasmide exprimant soit la forme sauvage de Est2 soit la forme Est2-up34. La Figure 35A montre que Pif1 est recruté sur une cassure non réparable et que son recrutement est augmenté en contexte télomérase "up". En revanche, la présence de Pif1 sur la cassure induite n'est pas dépendante de Est2 puisque l'enrichissement de Pif1 au niveau de la cassure est similaire après 3h d'induction dans les souches sauvages et *est2Δ*.

Afin de déterminer si le défaut d'interaction Pif1/Rfa1-D228Y a le même effet sur le recrutement de Pif1 en contexte sauvage et télomérase mutée, j'ai mesuré le recrutement de Pif1 à la cassure HO dans une souche *est2-up34 rfa1-D228Y*. La Figure 35C montre là encore, un défaut de recrutement de Pif1 dans le contexte télomérase "up"

Le modèle présenté par Boulé et collaborateurs (Boule, Vega, et Zakian 2005) propose que la télomérase *est2-up34* serait résistante à l'action de Pif1 et resterait fixée aux télomères entraînant le phénotype "télomères longs" observés dans ce mutant. La télomérase pourrait être recrutée au niveau des cassures double-brins de l'ADN et en être dissociée par Pif1. La forme *est2-up34*, résistante à l'action de Pif1 resterait fixée sur la cassure et expliquerait l'augmentation à la fois de Pif1 ainsi que de la télomérase sur la cassure d'ADN.

Le mécanisme de recrutement des protéines Pif1 et Est2-up34 au niveau d'une CDB serait donc similaire à celui décrit aux télomères. En effet, dans les deux cas, la mutation *est2-up34* augmente le recrutement ou la stabilité de Est2 à la cassure et au télomère ainsi que celui de Pif1.

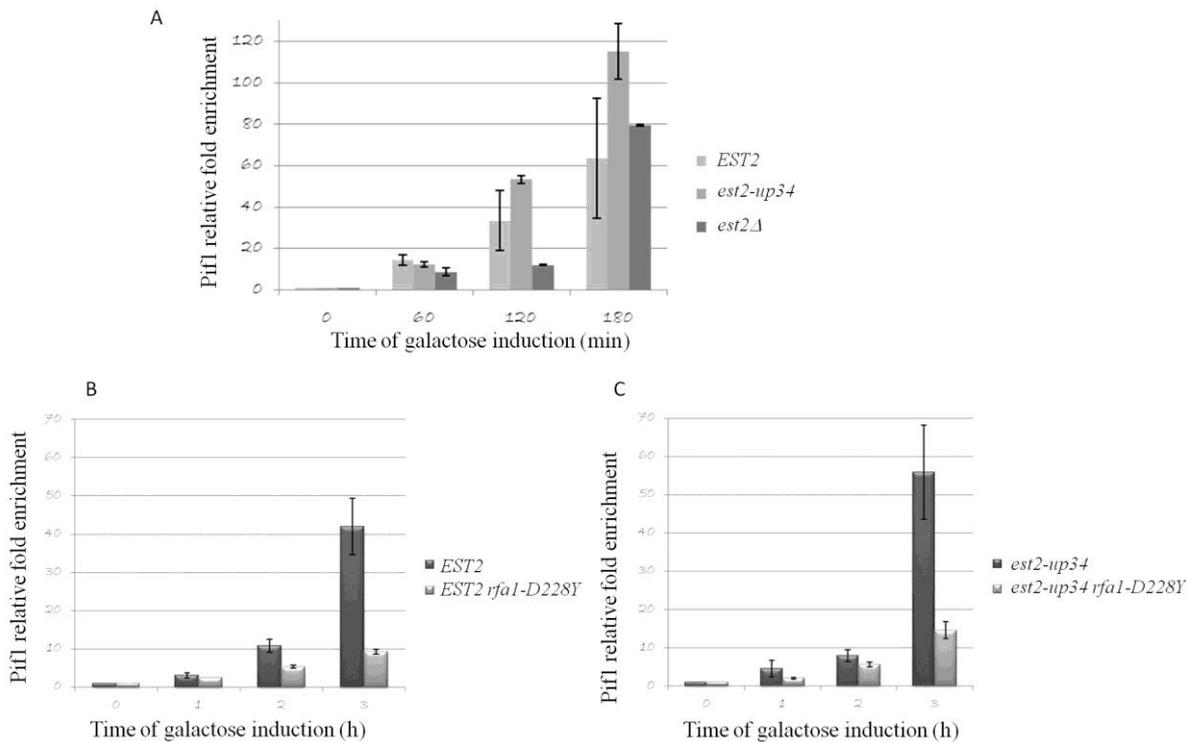


Figure 35 Le recrutement de Pif1 sur une cassure induite est augmenté dans le contexte *est2-up34*. Le recrutement de Pif1 a été analysé par qPCR en utilisant des oligonucléotides spécifiques du site de coupure MAT. Le bruit de fond est mesuré par amplification du locus Gal2. Les résultats sont exprimés par le ratio [(IP/Input)MatY]/[(IP/Input)Gal2]. La valeur obtenue au temps 0 est fixée arbitrairement à 1 pour toutes les souches. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types sur 2 expériences indépendantes sur lesquelles 3 qPCR ont été réalisées.

3. Pif1 interagit avec l'ARN de la télomérase "gain de fonction"

Lors de l'analyse des phénotypes télomériques de la mutation *est2-up34* menée en 2006, Eugster et ses collaborateurs ont mis en évidence une interaction entre Pif1 et l'ARN *TLC1* de la télomérase reflétant l'interaction entre Pif1 et la télomérase (Eugster et al. 2006). Grâce à des expériences de co-immunoprécipitation, nous avons confirmé qu'une interaction entre Pif1 et l'ARN *TLC1* était détectée dans un contexte télomérase "up" alors que l'interaction n'est pas détectable dans une souche sauvage (Figure 36).

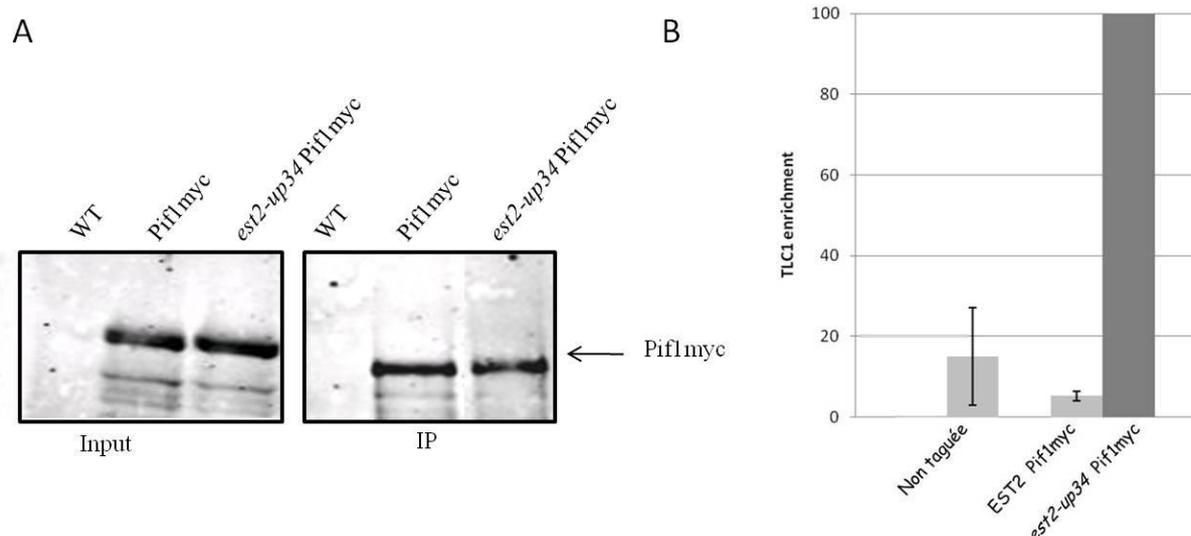


Figure 36 Pif1 interagit avec l'ARN *TLC1* de la télomérase "up". (A) L'immunoprécipitation de *Pif1myc* est analysée par Westernblot avec l'anticorps anti-myc (9E10 de chez Santa Cruz Biotechnology). (B) L'interaction *Pif1* / *TLC1* a été analysée par qPCR après l'immunoprécipitation de *Pif1myc* suivie d'une reverse transcription des ARN associés à *Pif1* grâce à l'utilisation d'hexamères. La quantité de *TLC1* immunoprécipité avec *Pif1myc* est quantifiée par qPCR avec des oligonucléotides spécifiques de l'ARN et exprimée par le ratio $[(IP/Input)TLC1]/[(IP/Input) Gal2]$. Les barres d'erreurs représentent les écarts types de 3 expériences indépendantes pour lesquelles 2 qPCR ont été réalisées.

Ces résultats confirment une interaction entre l'hélicase *Pif1* et la télomérase qui n'est détectable par la technique utilisée que dans un contexte télomérase "up". Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce résultat. L'absence d'interaction observée en conditions sauvages pourrait résulter d'une interaction trop transitoire pour être détectée. En effet, la télomérase *est2-up34* étant résistante à *Pif1*, la fixation de *Pif1* pourrait persister tant que la télomérase n'est pas décrochée de son substrat. La seconde hypothèse propose que la mutation *est2-up34* pourrait entraîner un changement de conformation de la protéine favorisant une interaction avec *Pif1* plus robuste. *Pif1* pourrait être recrutée par RPA aux cassures. *Pif1* ainsi recrutée décrocherait *Est2* sur des régions TG riches. Dans des régions très semblables aux séquences télomériques, *Cdc13* pourrait alors se fixer et recruter la télomérase *via* l'interaction avec *Est1*. La phosphorylation de *Cdc13* par *Mec1* serait un garde fou supplémentaire pour réduire la fixation de *Cdc13*.

4. La phosphorylation de Pif1 après induction de dommages à l'ADN n'est pas modifiée en contexte "télomérase up"

En 2009, Makovets et Blackburn montrèrent une phosphorylation de Pif1 dépendante de la kinase Mec1 après induction de dommages à l'ADN. La phosphorylation de Pif1 par Mec1 a pour rôle d'inhiber le recrutement de la télomérase sur une cassure induite. De façon indépendante, il a été montré que Mec1 phosphorylait Cdc13 aux CDB et que cette phosphorylation inhibait la fixation de Cdc13 sur l'ADN (Zhang et Durocher 2010a). Mec1 prévient ainsi la fixation de la télomérase par deux mécanismes différents, l'inhibition de la fixation de Cdc13 et la stimulation de l'activité de Pif1. Ces observations nous ont poussé à étudier la phosphorylation de Pif1 dans un contexte télomérase "up". Tout d'abord, alors que la phosphorylation de Pif1 a pour rôle d'inhiber le recrutement de la télomérase sur une cassure induite, la présence de la télomérase "up" augmente au site de coupure et son interaction avec Pif1 persiste. On ne peut pas exclure que le sur-recrutement de Est2-up34 pourrait donc être lié à un défaut de phosphorylation de Pif1. De plus le mutant *est2-up34* présente, comme le mutant *pif1Δ* une augmentation du taux de GCR principalement de la formation de télomères *de novo*, suggérant là encore un défaut d'inhibition de la télomérase par Pif1. Un défaut de phosphorylation de Pif1 pourrait expliquer l'inactivité de Pif1 chez le mutant télomérase up. Par exemple, l'interaction Pif1/télomérase "up" présenterait Pif1 dans une conformation non phosphorylable.

Afin de tester ces différentes hypothèses, j'ai étudié le niveau de phosphorylation de Pif1 dans différents contextes cellulaires. Afin d'induire des dommages à l'ADN, les cellules ont été traitées par 100 mM HU et 0.02% MMS pendant deux heures. L'immunoprécipitation de Pif1myc a été réalisée et les échantillons ont été traités ou non à la phosphatase. Les résultats obtenus montrent que l'induction de dommages à l'ADN provoque une phosphorylation de Pif1 comme précédemment décrit. En effet, l'addition de HU/MMS provoque un ralentissement de la migration de la protéine Pif1myc qui disparaît après traitement à la phosphatase (*Figure 37A*). Comme décrit précédemment, la phosphorylation de Pif1 est dépendante de Mec1, mais elle est par contre indépendante de Tel1 puisque seule la délétion de *MEC1* abolit le shift de Pif1 observé par Western blot (*Figure 37B*). D'après Makovets et Blackburn, il existe un niveau basal de phosphorylation indépendant des voies de signalisation des dommages à l'ADN (Makovets et Blackburn 2009). Selon les conditions d'expérimentation, un doublet correspondant à deux formes de la protéine Pif1 est observé en absence de dommage à l'ADN. Ce doublet pourrait correspondre soit à la phosphorylation

constitutive de Pif1 indépendante de Mec1 soit aux deux formes (nucléaire et mitochondriale) de Pif1.

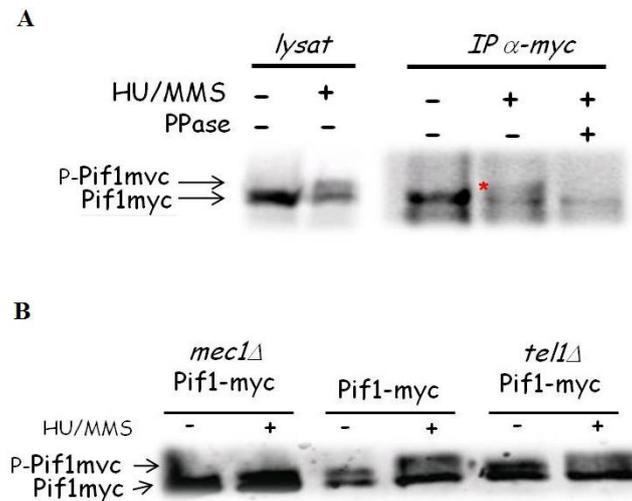


Figure 37 La phosphorylation de Pif1 est dépendante de Mec1 mais non de Tel1 après dommages à l'ADN. L'induction des dommages à l'ADN a été réalisée après traitement d'une culture asynchrone avec 100mM de HU et 0.02% de MMS pendant 2h à 30°C. La protéine Pif1myc a été immunoprécipitée avec un anticorps dirigé contre l'épitope myc et une fraction des échantillons ont été traités à la lambda phosphatase pendant 1h à 30°C avant que celle-ci ne soit désactivée.

Dans une deuxième étape, nous avons analysé le niveau de phosphorylation de Pif1 dans un mutant *est2-up34*. Comme décrit précédemment, les cellules ont été traitées par ajout de HU/MMS et, la protéine Pif1myc analysée sur gel acrylamide. Les résultats que j'ai obtenus ne sont pas complètement clairs. On observe effectivement que Pif1 est phosphorylé dans le mutant *est2-up34* mais une ambiguïté persiste sur la migration de Pif1 en absence de dommage de l'ADN en contexte *est2-up34* (Figure 38).

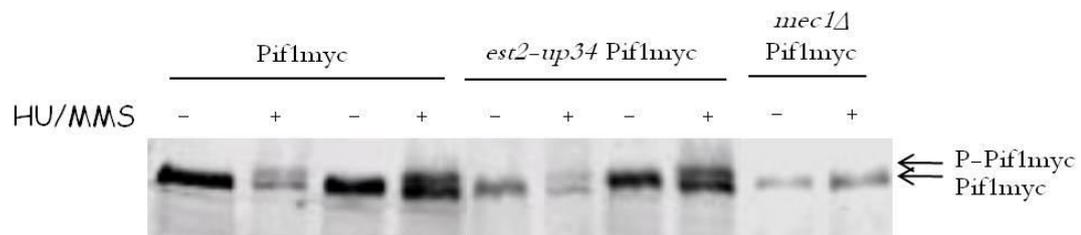


Figure 38 Phosphorylation de Pif1 dans le mutant *est2-up34*. L'ajout de HU 100mM et MMS 0.02% induit un shift de phosphorylation de Pif1 qui n'est pas modifié par la présence de la mutation *est2-up34*.

Ces résultats suggèrent que l'interaction de Pif1 avec la télomérase "up" ne semble pas avoir de conséquences sur l'état de phosphorylation de Pif1, mais cela reste à confirmer. Cela voudrait dire que la phosphorylation de Pif1 ne régulerait pas l'interaction Pif1/télomérase. De façon concordante, Makovets et Blackburn ont montré qu'un mutant non phosphorylable de Pif1 était recruté sur une cassure HO induite de façon similaire à la protéine sauvage.

III. L'interaction Pif1/RPA aux télomères

Une étude menée au laboratoire a montré que RPA était présent aux télomères et que la fixation de la protéine mutée Rfa1-D228Y était réduite de deux fois comparé à la protéine sauvage (Luciano et al. en révision). Suite aux résultats obtenus au niveau d'une cassure de l'ADN induite, nous avons étudié l'effet des mutations *rfa1-D228Y* et *pif1Δ* ainsi que du double mutant *pif1Δ rfa1-D228Y* sur la longueur des télomères.

Les résultats obtenus dans la Figure 39 montrent que la mutation *rfa1-D228Y* entraîne un raccourcissement de la taille des télomères dans le contexte d'une souche délétée du gène de la télomérase et complémentée soit par la copie sauvage de *EST2* soit par la copie *est2-up34*. En revanche, la mutation *rfa1-D228Y* n'affecte pas la longueur des télomères du mutant *pif1Δ*. Nous ne pouvons pas pour autant conclure à une relation d'épistasie entre les deux mutants puisque la mutation *rfa1-D228Y* n'a pas non plus d'effet sur la taille des télomères des cellules sauvages. De plus, si le modèle proposé aux CDB était similaire au niveau des télomères, la mutation *rfa1-D228Y* entraînerait un allongement de la taille des télomères des cellules sauvages. Nous suggérons que le rôle de RPA aux télomères est différent de celui observé au niveau d'une cassure de l'ADN. L'hypothèse selon laquelle RPA joue un rôle comme régulateur positif de la télomérase est privilégiée et en concordance avec les résultats de Luciano et al. (2011).

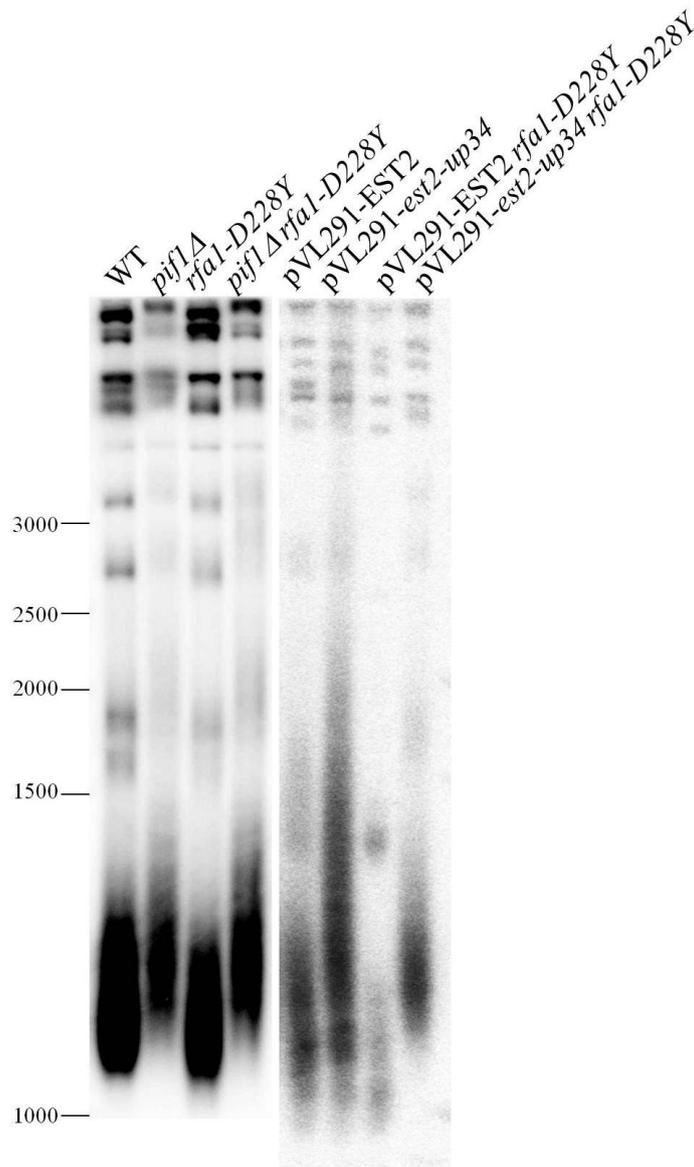


Figure 39 Effets des mutations *rfa1-D228Y* et *pif1Δ* sur la longueur des télomères. La mutation *rfa1-D228Y* entraîne un raccourcissement de la taille des télomères dans les souches *est2Δ* complémentées par un plasmide centromérique portant soit la forme sauvage soit la forme "up" de la télomérase.. L'ADN génomique a été digéré par l'enzyme de restriction *XhoI*. Le southernblot a été hybridé avec une sonde TG1-3 spécifique des répétitions télomériques.

IV. Rôle de l'interaction Pif1/RPA dans l'instabilité du minisatellite CEB1

Après la mise en évidence en 2009 du rôle de l'hélicase Pif1 dans la résolution des structures secondaires de l'ADN et plus spécifiquement dans le cas du minisatellite CEB1 qui forme des structures G4, (Ribeyre et al. 2009) nous avons recherché si l'interaction Pif1/RPA participait à la résolution des structure G4 lors de la réplication des brins avancés et retardés.

Pour cela, j'ai utilisé le système mis en place par l'équipe d'Alain Nicolas (Ribeyre et al. 2009) (Lopes et al. 2011) dans lequel l'allèle CEB1-1.8 du minisatellite humain est inséré proche de l'ARS305 du chromosome III de *S. cerevisiae* selon deux orientations possibles (Figure 40A). L'ARS 305 présente la particularité d'être éloignée de l'origine adjacente. En orientation I, CEB1-1.8 représente un substrat de la réplication avancée initiée au niveau de l'ARS305. A l'inverse, en orientation II, CEB1-1.8 représente un substrat de la réplication retardée (Figure 40B).

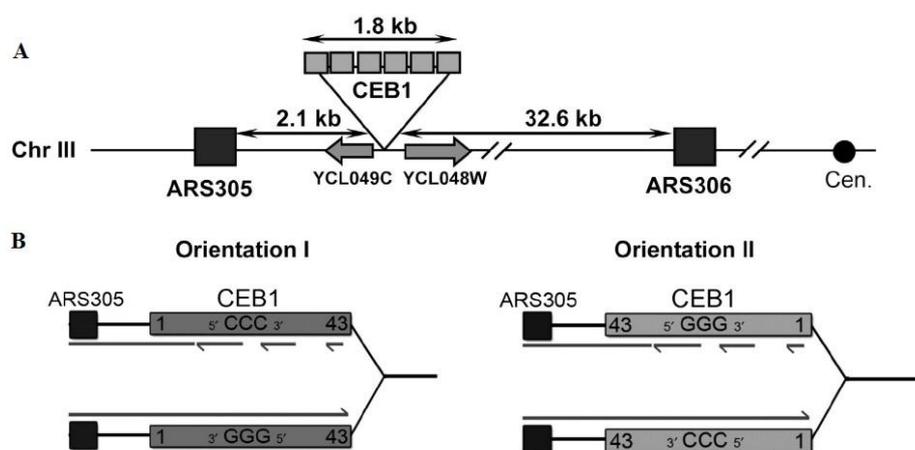


Figure 40 Représentation de l'insertion du minisatellite humain dans le génome de *S. cerevisiae* sur les brins avancé et retardé. (A) La séquence CEB1-1.8 a été insérée à proximité de l'ARS305 portée par le chromosome III. (B) La réplication du minisatellite CEB1 par la fourche de réplication est initiée à partir de l'ARS305. L'insertion en orientation I de CEB1 forme un substrat G4 sur le brin avancé alors qu'en orientation II, la structure G4 est présente sur le brin retardé (Lopes J. et al, 2011).

L'instabilité du minisatellite en orientation I qui se traduit par des événements de contractions ou des expansions, est analysée par Southern blot grâce à une sonde spécifique de CEB1 (Figure 41). Dans les cellules sauvages, nous observons une grande stabilité du minisatellite CEB1-1.8 en orientation I. En revanche, dans les cellules *rfa1-D228Y*, le minisatellite CEB1-1.8 en orientation I présente une grande instabilité avec une fréquence de réarrangements d'environ 50% dont la nature est principalement des contractions (Figure 41). De façon étonnante, alors que le rôle de RPA dans la réplication du brin retardé a été bien décrit, nous montrons ici qu'elle intervient également dans la réplication du brin avancé notamment dans la résolution des structures G4.

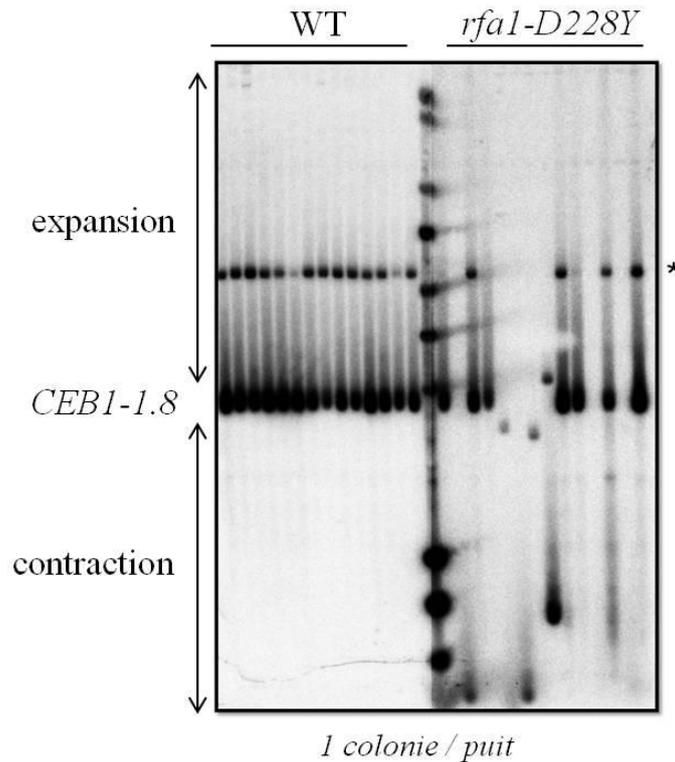


Figure 41 Instabilité du minisatellite CEB1-1.8 sur le brin avancé dans le mutant *rfa1-D228Y*. Cette instabilité se traduit par des réarrangements de CEB1-1.8, principalement des contractions. L'ADN génomique isolé à partir de 14 clones de la souche *rfa1-D228Y* et de la souche contrôle a été digéré par les enzymes de restriction *ApaI* et *XhoI* puis analysé par Southern blot grâce à une sonde $\alpha^{32}P$ -dCTP-CEB1. La bande marquée par une astérisque représente un fragment de digestion partielle de *XhoI*.

Afin de déterminer si l'instabilité du minisatellite en orientation I observée dans les mutants *pif1Δ* et *rfa1-D228Y* est dépendante de l'interaction entre les deux protéines nous avons analysé l'instabilité de CEB1-1.8 dans le double mutant *pif1Δ rfa1-D228Y*. Pour cela, la souche comportant le minisatellite a été croisée avec le double mutant *pif1Δ rfa1-D228Y*. L'expérience a été réalisée directement après analyse des tétrades. La Figure 42A montre une instabilité du minisatellite en orientation I dans les cellules *pif1Δ* de plus de 75%. En revanche l'instabilité dans le double mutant *pif1Δ rfa1-D228Y* n'est que de 50%. La différence de croissance entre les cellules *pif1Δ* et le double mutant *pif1Δ rfa1-D228Y* pourrait entraîner un biais dans l'expérience. En effet, la Figure 42B montre que le double mutant *pif1Δ rfa1-D228Y* forme de nombreuses petites colonies comparé aux cellules *pif1Δ* suggérant que les cellules *pif1Δ rfa1-D228Y* ont réalisé moins de cycles cellulaires que les cellules *pif1Δ*. Des problèmes techniques ne m'ont pas permis d'analyser le mutant *rfa1-D228Y* issu de cette même tétrade. Chaque cycle de réplication favorisant l'instabilité de CEB1-1.8, on ne peut donc pas exclure qu'à un nombre de cycles cellulaires équivalent, une plus grande instabilité

de CEB1-1.8 soit observable dans les cellules *pif1Δ rfa1-D228Y*. Ces résultats ne permettent donc pas de conclure clairement sur le rôle de l'interaction Pif1/RPA dans l'instabilité des structures G4 mais les résultats étonnant du rôle de RPA dans la réplication du brin avancé favorisent cette hypothèse.

Une autre hypothèse suggère un rôle de RPA dans l'instabilité du minisatellite CEB1-1.8 en aval du rôle de Pif1. Selon le modèle de J. Lopes et ses collaborateurs, Pif1 se fixerait sur l'ADN sb en aval du minisatellite et sa translocation de 5' vers 3' déroulerait la structure G4. Une fois la structure déroulée dans sa totalité, la réplication peut se poursuivre normalement. Lors du déroulement de la structure G4 par Pif1, RPA pourrait se fixer sur l'ADN sb formé afin de le stabiliser.

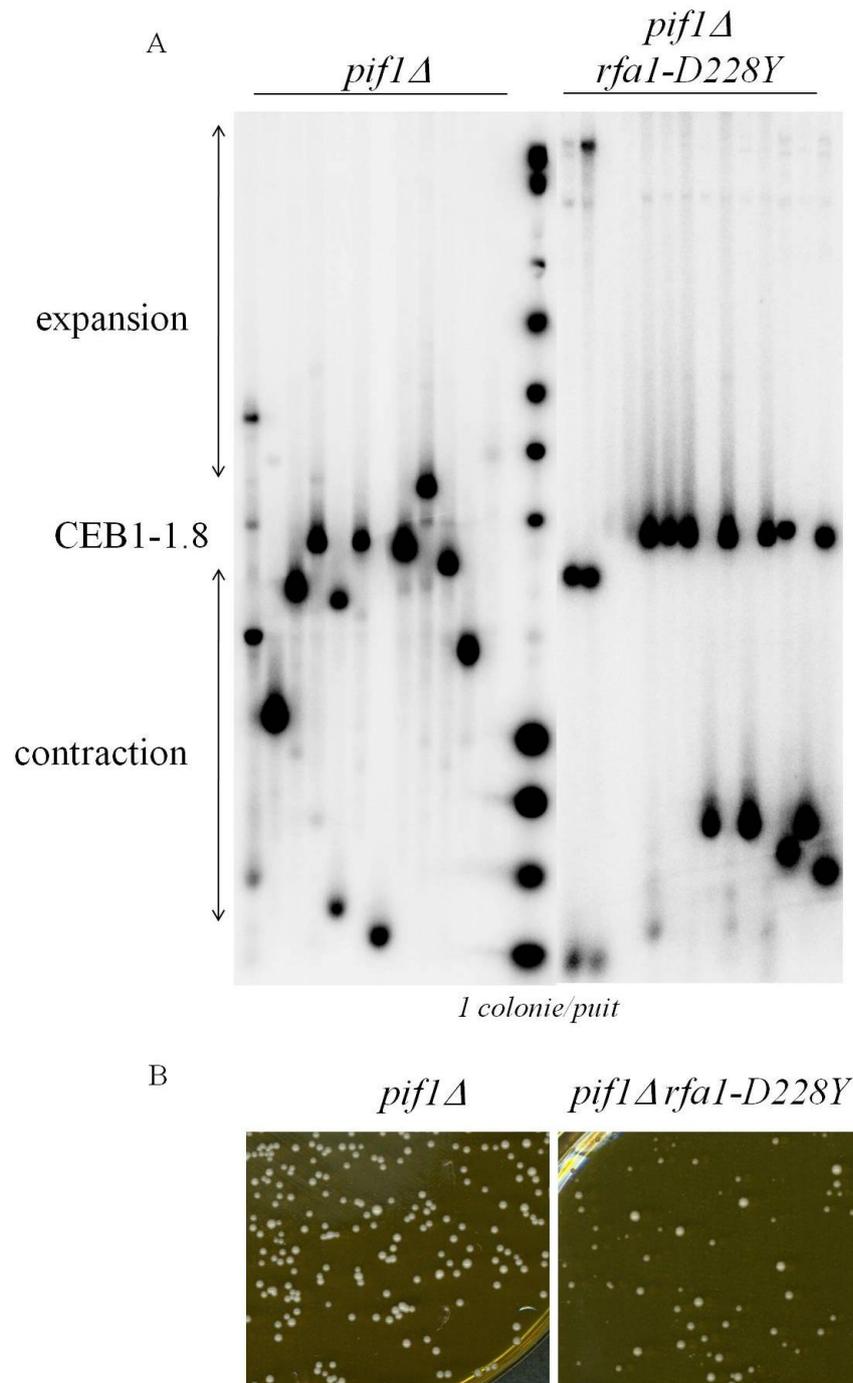


Figure 42 Instabilité du minisatellite CEB1-1.8 sur le brin avancé dans le double mutant *pif1* Δ *rfa1-D228Y*. (A) Instabilité de CEB1-1.8 mesurée à partir de l'ADN génomique de 14 clones dans les cellules *pif1* Δ et *pif1* Δ *rfa1-D228Y*. L'ADN génomique a été digéré par les enzymes de restriction *Apal* et *XhoI* puis analysé par Southern blot grâce à une sonde $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-CEB1. (B) Les colonies formées par le double mutant *pif1* Δ *rfa1-D228Y* sont plus petites que celles du mutant *pif1* Δ suggérant que le nombre de divisions effectuées avec la mesure de l'instabilité du minisatellite n'est pas équivalent entre les deux souches.

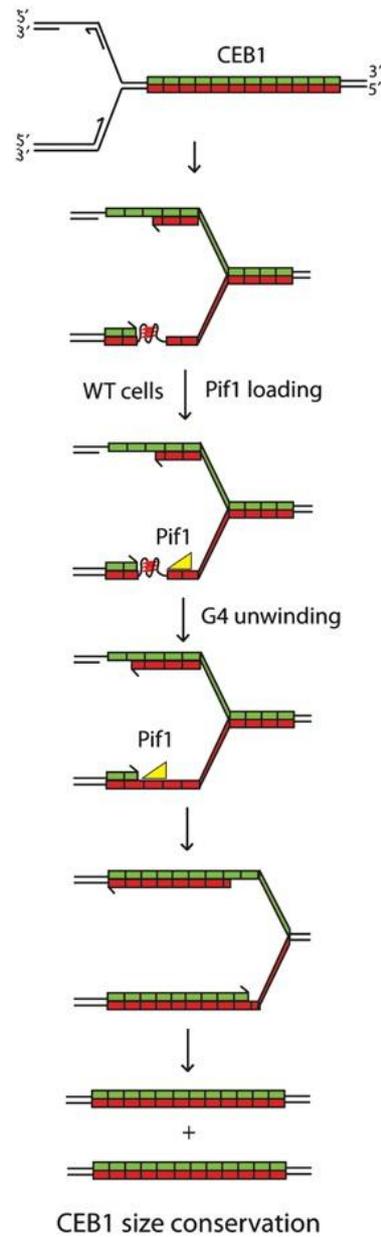


Figure 43 Déroulement des structures G4 du minisatellite CEB1-1.8 lors de la réplication du brin avancé. *Pif1* se fixerait sur l'ADN sb en aval du minisatellite et sa translocation de 5' vers 3' déroulerait la structure G4. Une fois la structure déroulée dans sa totalité, la réplication peut se poursuivre normalement (Lopes et al. 2011).

Chapitre 3:

Conclusión, Discusión

La protéine de réplication RPA joue un rôle déterminant dans la stabilité du génome puisqu'elle intervient dans toutes les transactions de l'ADN impliquant la formation d'ADN simple-brin. De nombreuses études récentes soulignent l'importance de l'hélicase Pif1 dans de nombreux aspects du métabolisme de l'ADN notamment au niveau de la régulation de la taille des télomères, au niveau des cassures de l'ADN ainsi que dans la réplication. Ce travail, a eu pour but de déterminer les liens unissant l'hélicase Pif1 et la protéine de réplication RPA chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* afin de comprendre leur rôle dans la stabilité du génome.

I. Une interaction Pif1/RPA impliquée dans le recrutement de Pif1 sur une CDB.

La protéine RPA stabilise les extrémités d'ADN simple-brin au niveau des CDB et participe à la voie de signalisation des dommages à l'ADN. L'hélicase Pif1 intervient également dans le processus de réparation et empêche la formation de télomères *de novo* aux CDB (Schulz et Zakian 1994). Lors de mes travaux, j'ai montré que l'hélicase Pif1 interagit physiquement avec la protéine de réplication RPA et que cette interaction est maximale en phase S du cycle cellulaire. J'ai identifié un allèle de *RFA1*, *rfa1-D228Y* qui affecte cette interaction et qui a servi d'outil à l'étude du rôle de cette interaction dans la réparation des CDB, la régulation de la taille des télomères et la réplication. J'ai mis en évidence que la perte de l'interaction Pif1/RPA dans le mutant *rfa1-D228Y* entraîne un défaut du recrutement de Pif1 sur la cassure d'ADN induite suggérant que RPA recrute Pif1 sur une cassure double-brins induite. Il est établi que la télomérase et l'hélicase Pif1 sont recrutées au niveau d'une CDB induite, mais le mode et la temporalité de leur recrutement restent obscurs. On peut supposer qu'aux CDBs, la télomérase est recrutée par la fixation de Cdc13 sur des régions de type TG1-3 et que Pif1 est recrutée par RPA. On ne sait pas néanmoins si Pif1 est recrutée avant ou après la télomérase afin de limiter l'ajout de séquences télomériques sur les CDBs. Cette question reste ouverte.

Lors d'une cassure de l'ADN, Pif1 est phosphorylée par Mec1 et inhibe l'activité de la télomérase empêchant ainsi la formation de télomère *de novo*. De plus, la forme non phosphorylable de Pif1 est recrutée sur la cassure de façon similaire à la protéine sauvage (Makovets et Blackburn 2009). Mec1, dont le recrutement aux CDBs dépend de RPA, phosphoryle aussi Cdc13 limitant la fixation de Cdc13 aux CDBs (Zhang et Durocher, 2010). Nous savons que la mutation *rfa1-D228Y* affecte le recrutement de Pif1 aux CDBs, mais nous n'avons pas testé la fixation de Pif1 sur les fourches bloquées.

Nous avons testé si l'interaction Pif1/RPA joue un rôle dans la phosphorylation de Pif1 par Mec1 en présence de HU/MMS dans les conditions décrites par Makovets et Blackburn (2009). Nous avons vu que le défaut d'interaction Pif1/Rfa1-D228Y n'affectait pas la phosphorylation de Pif1 en présence de fourches bloquées. Ce résultat pose la question du rôle de l'interaction RPA/Pif1 sur le recrutement de Pif1 aux fourches bloquées. A moins que la phosphorylation de Pif1 par Mec1 aux fourches bloquées soit indépendante du recrutement de Pif1 aux CDBs, mais cela est peu probable.

Pour aller plus loin dans notre interprétation, nous devons :

- i) tester la phosphorylation de Pif1 par Mec1 en contexte WT et *rfa1-D228Y* lors de l'induction de la cassure non réparable (on sait que la phosphorylation de Pif1 par Mec1 n'affecte pas le recrutement de Pif1 aux CDBs)
- ii) Mesurer le recrutement de Pif1 par ChIP en contexte WT et *rfa1-D228Y* sur les sites définis par Paeschke et Zakian (Paeschke et al. 2011).
- iii) Mesurer le recrutement de Pif1 par ChIP en contexte WT et *rfa1-D228Y* sur le minisatellite CEB1.

En collaboration avec l'équipe d'Eric Gilson, nous avons étudié le recrutement de Pif1 sur une CDB dans un contexte télomérase "up". La télomérase Est2-up34 appelé également "télomérase gain de fonction" semble être résistante à l'action de Pif1 et les cellules ont donc des télomères rallongés. Nous avons observé que le recrutement de la télomérase et de Pif1 sur une CDB induite, est augmenté dans des cellules *est2-up34* comparé aux cellules sauvages. En revanche, le recrutement de Pif1 dans les cellules *est2Δ* est similaire à celui observé dans les cellules sauvages suggérant que le recrutement de Pif1 aux CDB est indépendant de la présence de Est2. Le recrutement de Pif1 dans les cellules *rfa1-D228Y* est affecté de façon similaire dans les cellules *EST2* et *est2-up34*. Nous suggérons que Pif1 et Mec1 sont recrutés par RPA sur une CDB afin d'inhiber la fixation de la télomérase sur les séquences TG riches selon le modèle décrit ci-dessous (Figure 44). Dans le mutant *est2-up34*, l'interaction non productive entre la télomérase et Pif1 prolongerait le temps de présence à la cassure à la fois de Est2 et de Pif1. Il serait intéressant de mesurer le taux de GCR et leur nature dans un mutant *rfa1-D228Y*. Si ce modèle se confirme nous nous attendons à voir un taux élevé de GCR, notamment d'ajout de télomère *de novo* dans ce mutant. De plus, une étude a montré que le mutant *rfa1-t33 (Ser373/Pro)* affectant un résidu présent dans la région d'interaction avec l'ADN sb entraîne une augmentation importante du taux de GCR dont 45%

sont l'ajout de télomères *de novo* (Chen et Kolodner 1999). Il serait intéressant d'analyser l'interaction Pif1/RPA chez le mutant *rfa1-t33*.

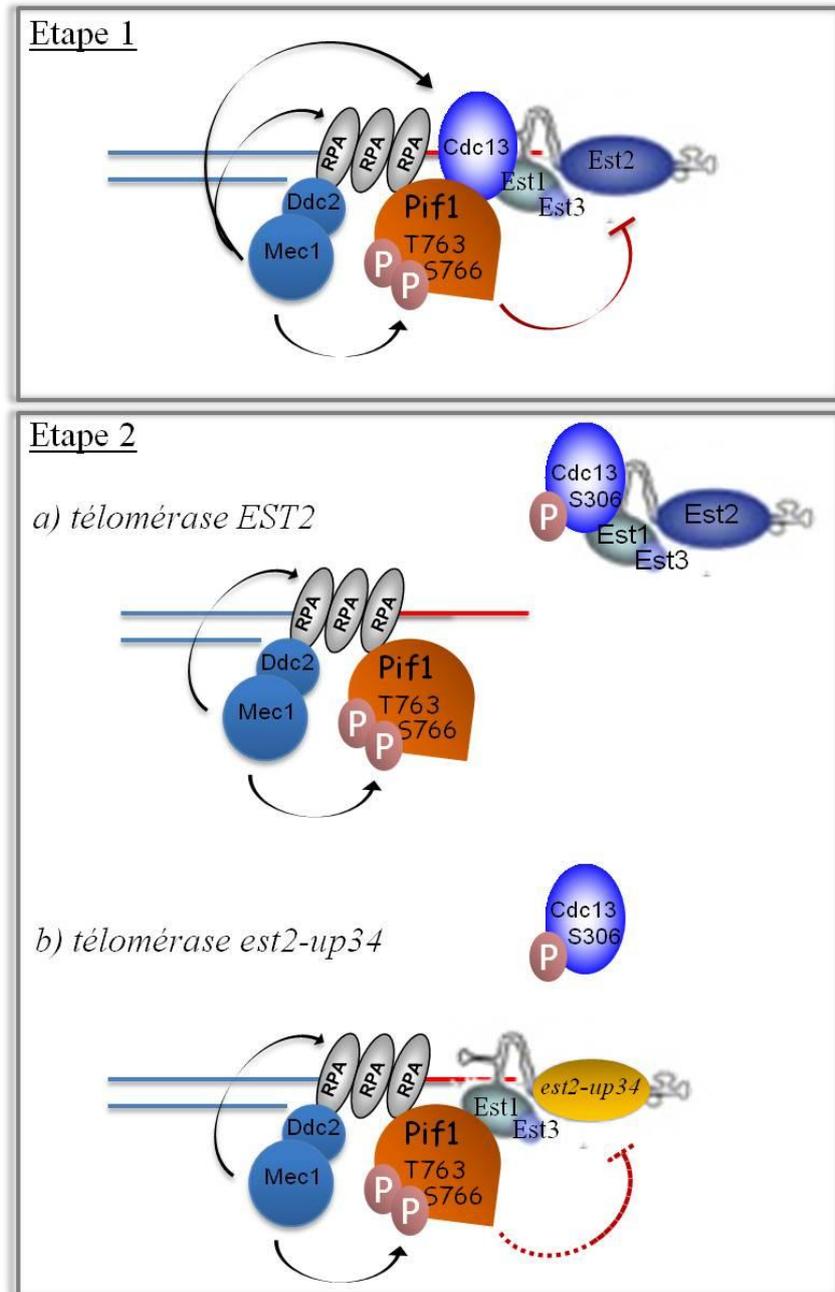


Figure 44 Modèle d'un mécanisme d'inhibition de la télomérase à une CDB non réparable à travers l'interaction Pif1/RPA. (Etape 1) Lors d'une cassure de l'ADN, RPA est recruté sur l'ADNsb et sert de plateforme de recrutement pour les protéines Pif1 et Ddc2/Mec1. Selon la nature des séquences nucléotidiques (TGGG), Cdc13 se fixe à la cassure. (Etape 2) La phosphorylation de Cdc13 sur le résidu S306 entraîne son décrochement de l'ADN. De plus la phosphorylation de Pif1 sur les résidus T763 et S766 a pour effet d'inhiber la télomérase au niveau de la cassure afin de prévenir la formation de télomère *de novo*. Dans un contexte *est2-up34*, la résistance de la télomérase à l'action de Pif1 prolonge sa présence à la cassure favorisant donc l'addition de télomère *de novo*.

II. Rôle de l'interaction Pif1/RPA aux télomères.

Par des analyses génétiques, nous avons voulu déterminer si le rôle de l'interaction Pif1/RPA décrit aux CDB est similaire au niveau des télomères. Nous avons pu montrer que la mutation *rfa1-D228Y* raccourcit les télomères d'une souche possédant un taux réduit de télomérase (pVL291-EST2) et diminue l'allongement et l'hétérogénéité des télomères du mutant *est2-up34*. Ces résultats sont en accord avec des résultats obtenus au laboratoire (Luciano et al. 2011) qui indiquent que RPA joue un rôle comme régulateur positif de la télomérase. Sur la Figure 39, la mutation *rfa1-D228Y* n'est pas épistatique à *pif1Δ*, néanmoins après avoir équilibré les télomères sur plus de 100 générations, les mutants *pif1Δ* et *pif1Δ rfa1-D228Y* semblent avoir des télomères de taille identique. Il est difficile de conclure dans la mesure où la mutation *rfa1-D228Y* affecte très peu la longueur des télomères d'une souche WT.

Récemment, il a été montré que des CDB non réparables pouvaient fixer la protéine affine du simple-brin télomérique Cdc13 dont l'une des fonctions est le recrutement de la télomérase (Oza et al. 2009). Le recrutement de télomérase induit l'addition d'un télomère *de novo*. En parallèle, deux études ont montré que la phosphorylation de Cdc13 et Pif1 par Mec1 déplaçait Cdc13 des CDBs et activait Pif1 empêchant ainsi la fixation de la télomérase aux CDB (Zhang et Durocher 2010) (Makovets et Blackburn 2009). De plus, la formation de télomères *de novo* à partir d'une cassure TG81-HO similaire à un télomère court ne semble plus être régulée par Pif1 (Zhang et Durocher 2010).

En conclusion, la kinase Mec1 s'oppose à l'addition de télomères *de novo* et favorise la recombinaison homologue, alors que la kinase Tel1 promeut l'élongation des télomères par la télomérase. Dans un contexte favorisant la fixation de Cdc13 plutôt que celle de RPA, l'absence de PIF1 n'a pas d'effet sur la fréquence d'ajout de télomères *de novo* comparé aux cellules sauvages (Zhang et Durocher 2010). De façon opposée, la diminution de la présence de Cdc13 au niveau d'un télomère érodé pourrait favoriser la fixation de RPA qui initierait le processus de RH en inhibant la télomérase *via* Pif1 et en favorisant le recrutement des différents acteurs de la réparation. Notre modèle est que la phosphorylation coordonnée de Cdc13, Pif1 et RPA par Mec1 ou Tel1 coordonne le choix entre addition de télomères par la télomérase, ou RH aux télomères érodés.

III. Rôle de l'interaction Pif1/RPA dans la réplication du brin avancé du minisatellite CEB1.

Le dernier aspect de ce travail s'est porté sur l'étude du rôle de l'interaction Pif1/RPA dans la réplication des structures G4 de l'ADN. De récents travaux ont montré un rôle de Pif1 dans la réplication du minisatellite CEB1 lorsque celui-ci est sur le brin avancé (Lopes et al. 2011). Nous avons mis en évidence que RPA est aussi impliqué dans la réplication du brin avancé de CEB1. En effet, le mutant *rfa1-D228Y* entraîne une instabilité d'environ 50% du minisatellite CEB1-1.8 lorsque celui-ci est répliqué par la machinerie du brin avancé. L'effet du double mutant *pif1Δ rfa1-D228Y* nous laisse suggérer un rôle de l'interaction Pif1/RPA sur l'instabilité de CEB1-1.8 mais les résultats ne nous ont pas permis de l'affirmer. En effet, le double mutant *pif1Δ rfa1-D228Y* présente un taux de réarrangements similaire au mutant *rfa1-D228Y* alors que l'instabilité de CEB1-1.8 est supérieure à 75% dans le mutant *pif1Δ*. Une différence de croissance entre les cellules *pif1Δ* et les cellules *pif1Δ rfa1-D228Y* biaise l'expérience puisque les deux souches n'ont pas effectué le même nombre de cycles de réplication au moment où l'instabilité de CEB1-1.8 a été mesurée. Bien que ces résultats soient à confirmer, il semble que les effets de *pif1Δ* et de *rfa1-D228Y* ne soient pas additifs suggérant que l'effet de *rfa1-D228Y* soit lié au défaut d'interaction entre RPA et Pif1. Une expérience décisive serait de mesurer chez le mutant *rfa1-D228Y* l'instabilité de CEB1 dans l'autre orientation afin de voir si la mutation *rfa1-D228Y* est une phénocopie de *pif1Δ*.

Une autre hypothèse serait un rôle de RPA dans l'instabilité du minisatellite CEB1-1.8 en aval du rôle de Pif1. Selon le modèle de J. Lopes et ses collaborateurs, Pif1 se fixerait sur l'ADNsb en aval du minisatellite et sa translocation de 5' vers 3' déroulerait la structure G4. Une fois la structure déroulée dans sa totalité, la réplication peut se poursuivre normalement. Lors du déroulement de la structure G4 par Pif1, RPA pourrait se fixer sur l'ADNsb formé afin de le stabiliser.

2eme Partie:

*Rôle de l'histone méthyl
transférase Set1 dans la régulation
de la taille des télomères*

Chapitre 1

Introduction

I. Organisation de la chromatine

1. Structure de la chromatine

Dans les années 1880, lors de l'étude des différents stades de la mitose, le biologiste Walther Flemming découvre une structure capable de retenir certains colorants qu'il nomma la chromatine. L'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome, composé d'un octamère d'histones de structure $2x(H2A, H2B, H3, H4)$ autour duquel 147 pb d'ADN s'enroulent de façon à former 1.7 tours. La fonction principale du nucléosome est la compaction de la chromatine au sein du noyau des cellules des eucaryotes. Il constitue le premier degré de compaction de l'ADN dans le noyau qui subit une deuxième étape de compaction au cours de laquelle les nucléosomes vont interagir entre eux pour former la fibre chromatinienne de 30 nm de diamètre également appelée "solénoïde", constitué de 6 nucléosomes par tour en hélice droite. La fibre de 30 nm décrit à son tour des boucles appelées "domaines en boucles" (*Figure 45*). L'organisation dynamique de la structure chromatinienne rend l'ADN accessible aux machineries protéiques impliquées dans la réplication, la réparation et la recombinaison. Les régions décondensées de la chromatine sont actives au niveau transcriptionnel et sont appelées euchromatine. A l'opposé, l'hétérochromatine correspond à un état condensé de la chromatine. On peut distinguer l'hétérochromatine constitutive, répliquée tardivement, correspondant à des portions de chromosomes inactives et porteuse de séquences courtes et répétées en tandem, dont les plus grandes parties se trouvent à proximité des centromères et des télomères. L'hétérochromatine facultative est quant à elle, réversible.

Les modifications épigénétiques constituent un ensemble complexe d'étapes étroitement interconnectées et dépendantes qui permettront de moduler l'activité transcriptionnelle des gènes. Les extrémités aminotermiales des histones, qui font saillie à l'extérieur du nucléosome, sont la cible privilégiée de modifications épigénétiques responsables de l'état transcriptionnel de la chromatine selon le «code histone» (Jenuwein et Allis 2001). Les modifications épigénétiques de la chromatine télomérique jouent un rôle dans le contrôle de la longueur des télomères. En effet, les régions télomériques et subtélomériques montrent des modifications des histones qui ont pour conséquence de changer localement la nature de la chromatine et de moduler l'accessibilité de l'ADN fournissant ainsi une variété de surfaces d'interaction alternatives à divers facteurs.

Chacune des histones constituant le cœur du nucléosome contient une extrémité N-terminale flexible de 11 à 37 résidus qui s'étend à partir de la structure fixe du nucléosome. Ces extrémités, particulièrement riches en résidus lysine et arginine sont appelées les queues d'histones. Elles sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles pouvant affecter leurs charges mais aussi l'accessibilité à l'ADN et les interactions protéines/protéines avec le nucléosome.

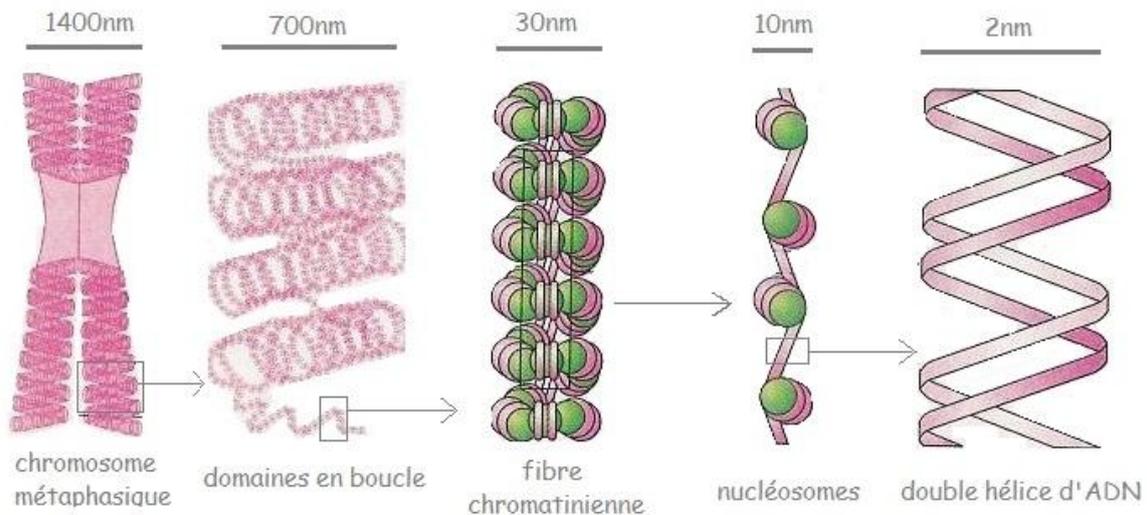


Figure 45 Les différents niveaux de condensation de la chromatine. L'ADN double-brin s'associe à des nucléosomes dont la configuration dépliée forme un "collier de perles". La fibre chromatinienne formée d'un surenroulement de six nucléosomes par tour se condense à son tour afin de former les domaines en boucles. Le chromosome métaphasique forme une structure compacte où l'ADN est hautement condensé.

2. Les modifications covalentes des histones

Les histones sont de petites protéines basiques dont le domaine central structuré en trois hélices séparées par deux boucles constitue la région la plus conservée au cours de l'évolution. A l'opposé, les extrémités N-terminales des histones riches en lysines et arginines sont plus variables et dépourvues de structures secondaires.

Divers processus tels que la réplication, la transcription, ou la réparation nécessitent que la chromatine soit accessible à des facteurs impliqués dans ces processus. Cela nécessite un changement structural de la chromatine, induit soit par des modifications post-traductionnelles des queues d'histones, soit grâce à l'action de complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP. Les queues d'histones, mais aussi certaines régions de la structure globulaire des histones, qui semblent contribuer à la stabilité du nucléosome peuvent être la cible de modifications post-traductionnelles incluant l'acétylation, l'ubiquitination et la

sumoylation de résidus lysines; la phosphorylation de résidus sérines et thréonines et la méthylation de résidus lysines et arginines (*Figure 46*). Les différentes combinaisons de ces modifications établissent un motif spatial complexe appelé "code histone" (Jenuwein et Allis 2001).

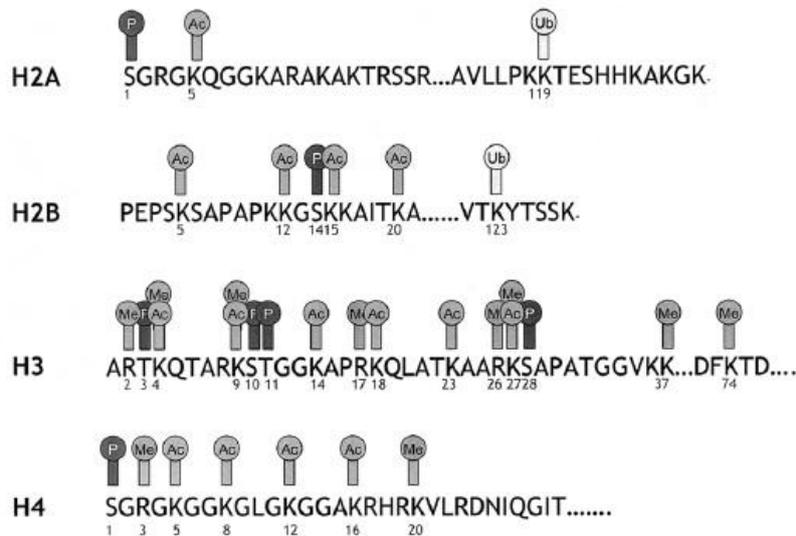


Figure 46 Modifications épigénétiques des nucléosomes. La région N-terminale des queues d'histones H2A, H2B, H3 et H4 est soumise à de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation (Ac), la méthylation (Me), l'ubiquitination (Ub) et la phosphorylation (P).

2.1. L'acétylation des histones

La modification des histones par acétylation a été découverte il y a plus de 40 ans, puis corrélée en 1964 avec une augmentation de la transcription (Allfrey et al. 1964). Il fallut attendre l'identification des premières acétylases (Brownell et al. 1996) et déacétylases (Taunton et al. 1996) régulant l'acétylation des histones afin de valider cette hypothèse. L'acétylation des histones est un mécanisme réversible issu de l'action antagoniste de deux types d'enzymes, les Histones Acétyl Transférases (HAT) qui catalysent le transfert d'un groupe acétyle de l'acétyl-CoA vers un groupement amine (NH_3^+) ϵ d'une lysine située sur la queue N-terminale de l'histone (*Figure 47*) et les Histones DéAcétylase (HDAC). Les résidus cibles sont principalement localisés sur les histones H3 (K9, K14 et K18) et H4 (K5, K8, K12 et K16). L'acétylation des histones H2A et H2B est quant à elle moins bien caractérisée. A ce jour, les enzymes HAT et HDAC ont été identifiées chez différents organismes et impliquées dans la régulation de nombreux gènes confirmant ainsi le lien entre l'acétylation et la transcription.

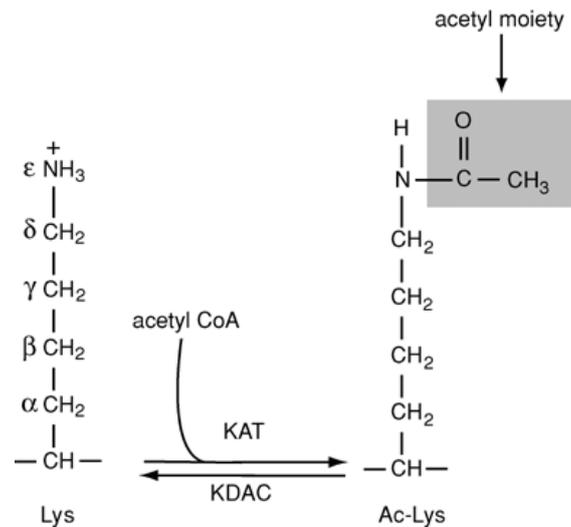


Figure 47 Réactions d'acétylation et de désacétylation des lysines de la queue N-terminale des histones. La lysine acétyl transférase (KAT) permet le transfert du groupe acétyle de l'acétyl-CoA vers le groupement ϵ (NH₃⁺). A l'inverse, la lysine désacétylase (KDAC) entraîne la désacétylation du même résidu (Adcock et Lee 2006).

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires reliant l'acétylation des histones et l'activation transcriptionnelle, une hypothèse selon laquelle l'acétylation des histones pourrait modifier la structure des nucléosomes et influencer la fixation de certaines protéines sur l'ADN a été émise (Verdone et al. 2005).

Les Histones acétyltransférase (HAT).

A ce jour, neuf protéines présentant une activité HAT ont été identifiées chez *S. cerevisiae* (Gcn5, Hat1, Elp3, Hpa2, Esa1, Sas2, Sas3, Nut1 et Hat1). Ces observations démontrent qu'une des fonctions de l'acétylation des histones néo-synthétisées est de faciliter l'assemblage de nucléosomes couplé à la synthèse d'ADN non seulement durant la réplication, mais aussi lors de la réparation.

Tableau 2 Chacune de ces HAT est capable d'acétyler spécifiquement un ou plusieurs résidus lysines et certaines d'entre elles appartiennent à des complexes impliqués dans la régulation de la transcription. Alors que les HAT Hat1 (Kleff et al. 1995) et Esa1 (Smith et al. 1998);(Clarke et al. 1999) modifient spécifiquement l'histone H4, les autres HAT modifient préférentiellement l'histone H3 et en particulier la lysine K14, *in vitro*. En effet, il a été montré *in vitro* que Gcn5 (Kuo et al. 1996) (Tse et al. 1998) (Grant et al. 1999), Sas3 (Howe et al. 2001), Hpa2 (Angus-Hill et al. 1999), Elp3 (Winkler et al. 2002) et Taf1 (Mizzen et al. 1996) ont comme résidu cible commun H3K14. De la même façon, Nut1 acétyle préférentiellement l'histone H3 mais la spécificité de ses résidus cibles est encore inconnue.

Le complexe SAS formé de l'acétylase Sas2 liée aux protéines Sas4 et Sas5 acétyle les histones libres H3 sur leur résidu K14 (Talley et al. 2011) mais sa spécificité pour les histones assemblées en nucléosome semble limitée à H4 (Shia et al. 2005). *In vivo*, il a été mis en évidence un recrutement des HAT Sas3 et Gcn5 au niveau des gènes hautement transcrits (Rosaleny et al. 2007). La létalité du double mutant *sas3Δ gcn5Δ* indique qu'en absence de Gcn5, Sas3 est essentielle à l'acétylation. Gcn5 et Sas3 semblent donc jouer un rôle redondant dans l'acétylation des histones, essentiel à la progression du cycle cellulaire (Howe et al. 2001).

Ces observations démontrent qu'une des fonctions de l'acétylation des histones néo-synthétisées est de faciliter l'assemblage de nucléosomes couplé à la synthèse d'ADN non seulement durant la réplication, mais aussi lors de la réparation.

Tableau 2 Représentation des différentes familles d'HAT et leurs cibles

HAT families	
GNATs (Gcn5-related acetyltransferase)	
Hat1	H4/H2A
Gcn5 and Gcn5L	H3 K9/K14/H2B, c-Myc
Elp3	H3/H4
Hpa2	H3/H4
PCAF	H3/H4, c-Myc, GATA2
MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60-related)	
Esa1	H4/H2A
Tip60	H4/H2A, c-Myc, AR
MOF	H4 K16/H3/H2A
MOZ	
Sas3	H3/H4
Sas2	H4K16
P300/CBP	
P300/CBP	H2A/H2B/H3/H4, p53, p65, AR, ER
General transcription factor HATs	
TAF250	H3/H4
TFIIIC	H2A/H3/H4
Nuclear hormone related HATs	
SRC1	H3/H4
SRC3/ACTR	H3/H4

Les Histones Déacétylases (HDAC).

Alors que l'hyperacétylation des histones est associée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle, l'hypoacétylation est quant à elle associée à la répression de l'expression des gènes (Wade 2001) (Ito et al. 2000) (Forsberg et Bresnick 2001). Le signal initiateur de ce processus de répression est situé sur l'ADN. En effet, la méthylation des cytosines présentes

au niveau des îlots CpG est directement responsable du recrutement des complexes HDAC *via* la fixation de protéines aux îlots CpG méthylés ou *via* les ADN méthyltransférase responsables de cette méthylation. L'hypoacétylation des histones entraîne une diminution de l'espacement entre les nucléosomes ainsi que de l'ADN qui les entoure, ce qui réduit l'accessibilité à l'ADN des facteurs de transcription, menant ainsi à la répression transcriptionnelle (Wade 2001); (Strahl et Allis 2000) (Yoshida et al. 2001).

Deux familles de protéines à activité HDAC ont été identifiées. La famille "classique" d'HDAC comprend deux classes phylogénétiques différentes appelées classe I et classe II. Les HDACs de classe I (HDAC1, 2, 3 et 8) et de classe II (HDAC4,5,6) dérivent d'un ancêtre commun et sont représentées respectivement par Rpd3 et Hda1 chez la levure *S. cerevisiae* (Rundlett et al. 1996). Plus récemment la famille Sir2 comprenant les HDACs de classe III a été identifiée. Ces HDACs possèdent une activité désacétylase dépendante du NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) (Di Gennaro et al. 2004).

Tableau 3 Représentation des différentes familles d'HDAC et leurs cibles

HDAC families	Substrate
Class I (Rpd3 homologs)	
HDAC 1	H2A, 2B, 3, 4, AR, ER, SHP, YY1
HDAC 2	H2A, 2B, 3, 4, GR, YY1
HDAC 3	H2A, 2B, 3, 4, GR, SHP, GATA1, YY1
HDAC 8	H2A, 2B, 3, 4
Class II (Hda1 homologs)	
HDAC 4	H2A, 2B, 3, 4, GATA1
HDAC 5	H2A, 2B, 3, 4, GATA1
HDAC 6	H2A, 2B, 3, 4, tubulin, SHP
HDAC 7	H2A, 2B, 3, 4
HDAC 9	H2A, 2B, 3, 4
HDAC 10	H2A, 2B, 3, 4
Class III (Sir2 homologs)	
SIRT 1	} Non-histone proteins e. g. tubulin, p65, p53
SIRT 2	
SIRT 3	
SIRT 4	
SIRT 5	
SIRT 6	
SIRT 7	

2.2. Méthylation des histones

Longtemps considérée comme statique, la méthylation des histones s'avère être une modification réversible impliquée dans des processus dynamiques. Elle peut s'effectuer sur

des lysines ou des arginines et peut correspondre à l'ajout d'un, deux ou trois groupements méthyles. Selon les résidus méthylés et le nombre de groupements ajoutés, elle est associée soit à une activation soit à une répression de la transcription. Les enzymes responsables de ces modifications, les Histones Méthyltransférases (HMT), utilisent la S-adénosylméthionine (SAM) comme donneur de groupements méthyles. Ces HMT sont classées en deux familles selon l'acide aminé modifié. Les PRMT (Protein Arginine Methyltransferase) méthylent les arginines, tandis que les KMT (Lysine Methyltransferase) méthylent les lysines.

Les Arginines méthyltransférases ou PRMT.

La méthylation des arginines est présente sous forme mono- et diméthylée grâce à l'action d'HMT spécifiques des arginines. Celles-ci peuvent être divisées en deux classes selon la configuration symétrique ou asymétrique de la diméthylation qu'elles catalysent. La classe I comprend trois enzymes, PRMT1 (Lin et al. 1996), PRMT3 (Tang et al. 1998), et CARM1/PRMT4 (Chen et al. 1999) chez les mammifères alors qu'une seule PRMT a été identifiée chez la levure, HMT1 (Gary et al. 1996). Ces enzymes de type I catalysent une diméthylation asymétrique. La classe II qui catalyse une diméthylation symétrique comprend les enzymes PRMT5 et PRMT7 (*Figure 48*) . Les cibles de ces différentes PRMT sont présentées dans le Tableau 4.

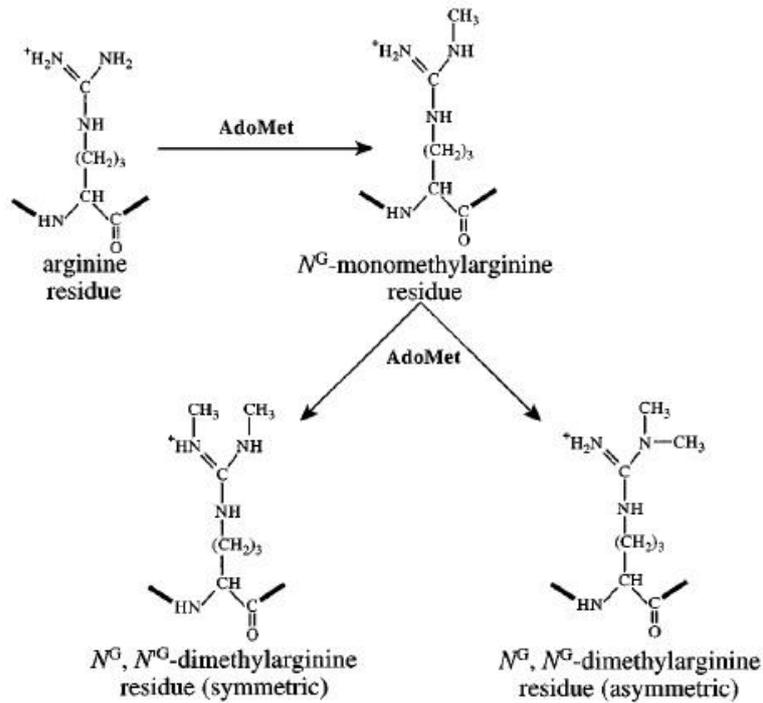
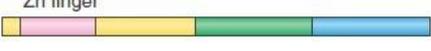
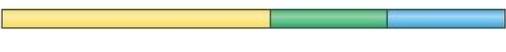


Figure 48. Méthylation des résidus arginines. Les arginines méthyltransférases appelées les PRMTs de classe I et II catalysent la diméthylation d'un résidu arginine de manière asymétrique et symétrique respectivement (Gary et al. 1996).

Tableau 4 Représentation structurale des PRMTs, leur cible et leur activité.
 Les cinq PRMTs identifiées chez les mammifères possèdent toutes un domaine très conservé pour la fixation de SAM (vert). La région C-terminale (bleu) est également très conservée. Les domaines SH3 (rouge) et Zn (rose) sont spécifiques de certaines enzymes (Kouzarides 2002).

		Sites of methylation on histones	Type of methylation
PRMT1		H4 Arg 3	Asymmetric
PRMT2		Not yet shown to be an enzyme	Asymmetric
PRMT3		Not known on histones	Asymmetric
PRMT4/CARM1		H3 Arg 2, 17, 26	Asymmetric
PRMT5/JBP1		H2A, H4 and H3 Arg 8	Symmetric

Le rôle de la méthylation des résidus arginines présents sur les queues d'histones n'est pas encore bien défini à l'heure actuelle. En effet selon la modification étudiée, un effet activateur ou répresseur de la transcription est observé.

La méthylation de l'arginine 3 de l'histone H4 par l'HMT PRMT1 semble jouer un rôle important dans la régulation de la transcription. Cette modification est très conservée à travers les espèces, que ce soit dans les cellules de mammifère, de poulet ou encore chez la levure. Il a été montré que cette modification stimule la transcription. En effet la méthylation de H4R3 facilite l'acétylation de H3K8 par l'acétylase p300/CBP (Wang et al. 2001). A l'inverse Hmt1, responsable de la méthylation de H4R3, est impliquée dans l'extinction de gènes dans certaines régions telle que le rDNA. En effet, l'activité de Hmt1 entraîne le recrutement de la déacétylase Sir2 au niveau des régions chromatiniennes réprimées (Yu et al. 2006).

Les Lysines méthyltransférases ou KMT.

En 2000, la première KMT Su(var)3-9 ayant pour cible la lysine 9 de l'histone H3 a été identifiée chez la Drosophile (Rea et al. 2000). A l'exception de Dot1, les KMT possèdent toutes un domaine catalytique conservé, le domaine SET (Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax). En plus de ne pas avoir de domaine SET, Dot1 a la particularité de modifier un résidu (H3K79) présent au niveau de la surface du nucléosome et non sur les queues d'histones (van Leeuwen, Gafken, et Gottschling 2002). Chez l'homme, quatre familles de KMTs à domaine SET ont été identifiées, SET1, SET2, SUV39 et RIZ.

- ✓ La famille SUV39 regroupe des protéines qui ont en commun un domaine "PRE-SET" en amont du domaine SET, nécessaire à l'activité enzymatique, qui contribue à la

spécificité de la méthylation de H3K9 (Rea et al. 2000). Les enzymes de cette famille de KMTs possèdent également un chromodomaine dont la fonction reste inconnue.

- ✓ La famille SET1 regroupe des protéines qui possèdent toutes un domaine SET à l'extrémité C-terminale de la protéine très souvent suivi d'un domaine "POST-SET".
- ✓ La famille SET2 regroupent des protéines présentant un domaine SET au niveau de leur extrémité C-terminale, suivi d'un domaine "POST-SET" et précédé d'un domaine AWS, domaine riche en cystéine qui pourrait jouer un rôle dans l'activité enzymatique de façon similaire au domaine "PRE-SET" décrit précédemment.
- ✓ La famille RIZ (Retinoblastoma-interacting zinc finger) regroupe des protéines qui présentent une structure très similaire. En effet, leur domaine SET est localisé dans la région N-terminale. Elles n'ont ni domaine PRE ou POST-SET mais possèdent de nombreux motifs en doigt de zinc regroupés dans la région C-terminale de la protéine ainsi qu'un domaine NHSC très conservé, essentiel à l'activité enzymatique.

Les membres de ces différentes familles ainsi que leur structure sont représentés dans la Figure 49.

Chez *S. cerevisiae* il existe deux KMTs à domaine SET, Set1 et Set2 catalysant la méthylation des lysines H3K4 et H3K36 respectivement. La protéine Set1 appartenant à la famille SET1 est la seule KMT catalysant la mono-, di- et triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4). Cette modification est corrélée à l'activation de gènes hautement transcrits par l'ARN polymérase II et impliquée dans divers processus tels que l'extinction des gènes au niveau des télomères et de l'ADNr (Nislow, Ray, et Pillus 1997a), la réparation de l'ADN (Corda et al. 1999) (Schramke et al. 2001) (Faucher et Wellinger 2010) ainsi que dans la recombinaison méiotique (Sollier et al. 2004) (Borde et al. 2009). La protéine Set2 appartenant à la famille SET2 catalyse la méthylation de la lysine 36 de l'histone H3 impliquée dans la régulation de l'élongation de la transcription et la déacétylation des régions codantes *via* le recrutement de la déacétylase Rpd3 (Keogh et al. 2005) (Biswas et al. 2006).

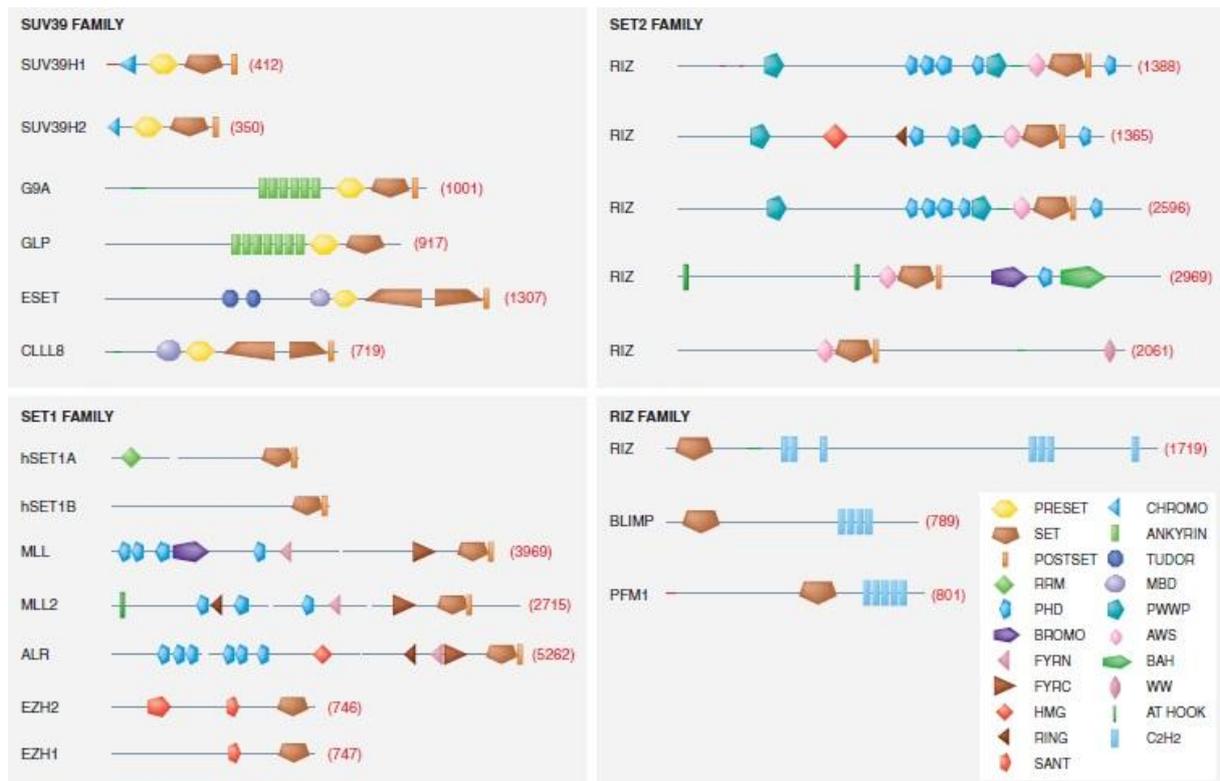


Figure 49 Représentation des 4 familles de KMTs. Les KMTs identifiées ont été regroupées en quatre familles en fonction de leur particularité de structure. Les membres de la famille SUV39 possèdent un domaine SET en région C-terminale, encadré des domaines "PRE-SET" et "POST-SET". Les membres de la famille SET1 possèdent un domaine SET en région C-terminale suivi d'un domaine "POST-SET". Les protéines Ezh1 et Ezh2 ne possédant pas ces domaines "POST-SET" peuvent être considérés comme une sous-famille de la famille SET1. Les membres de la famille SET2 possèdent un domaine SET en région C-terminale suivi d'un domaine "POST-SET" et précédé d'un domaine AWS. Les membres de la famille RIZ possèdent un domaine SET en région N-terminale ainsi que de nombreux motifs doigt de zinc en région C-terminale (Kouzarides 2002).

2.3. Phosphorylation des histones

Il a été montré que le niveau global de phosphorylation des histones varie au cours du cycle cellulaire (Bradbury et al. 1973) et se caractérise notamment par la présence d'un pic de phosphorylation du résidu sérine 10 de l'histone H3 au cours de la mitose (Gurley et al. 1978). Chez *S. cerevisiae*, la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 est catalysée par la kinase Snf1 lors de l'activation transcriptionnelle et par Ilp1/Aurora durant la condensation des chromosomes mitotiques. En 2005, il a été montré que l'HAT Gcn5 interagit avec Snf1 qui lui-même phosphoryle Gcn5. (Liu et al. 2005). La phosphorylation de H3S10 par Snf1 entraîne une augmentation de l'acétylation de H3K14 par l'HAT Gcn5 au niveau de promoteurs de gènes entraînant leur activation (Lo et al. 2000).

Par ailleurs, en réponse à certains dommages de l'ADN, le résidu sérine 129 de l'histone H2A est phosphorylé sur plusieurs mégabases par la kinase Tel1 autour d'une cassure de l'ADN et permettrait le recrutement de complexes de remodelage de la chromatine afin de faciliter l'accès de la machinerie de réparation à l'ADN (Downs et al. 2004).

La phosphorylation des histones est donc une modification post-traductionnelle impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires.

2.4. Ubiquitination des histones

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui consiste en la fixation covalente d'un peptide de 76 aa très conservé entre les espèces. En 1975, Harrison Busch découvrit la première protéine isolée de cellules HeLa, à être modifiée par l'ubiquitine (Osley 2004). Ce n'est qu'en 2000 que cette modification pu être étudiée avec la découverte chez *S. cerevisiae* de l'ubiquitination de l'histone H2B (Robzyk et al. 2000). Alors que l'ajout de plusieurs copies d'ubiquitine est lié à la dégradation par le protéasome des protéines modifiées, la modification des histones ne met en jeu qu'une simple mono-ubiquitination non dégradative d'une lysine dans le domaine C-terminal des histones H2A et H2B. Cette modification exercerait un rôle dans la formation de l'hétérochromatine, dans la régulation de la transcription et la réparation de l'ADN. L'enzyme Rad6 complexée avec l'ubiquitine-ligase Bre1 est responsable de l'ubiquitination du résidu lysine K123 de l'histone H2B, seul résidu connu pour être ubiquitiné chez *S. cerevisiae* (Robzyk et al. 2000).

L'ubiquitination de H2BK123 régule la méthylation de H3K4 dépendante de Set1. En effet, la méthylation de H3K4 est totalement abolie dans un mutant H2BK123R dans lequel la lysine K123 a été mutée en arginine non-ubiquitinable et un défaut de TPE est observé (Sun et Allis 2002). L'ubiquitination de H2BK123 régule aussi la méthylation de H3K79 dépendante de Dot1 (Ng et al. 2002). Il existe donc une régulation des modifications d'histones en *trans* qui impliquerait le recrutement de remodeleurs dont l'activité sur les nucléosomes faciliterait l'accès des histones méthyltransférases.

2.5. Sumoylation des histones

La sumoylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en la fixation covalente d'un peptide de 100 aa nommé SUMO (SMT3 chez *S. cerevisiae*) sur des résidus lysines. La sumoylation des histones et plus spécifiquement de l'histone H4 a été décrite pour la 1ère fois en 2003 dans les cellules humaines (Nathan et al. 2003). Chez *S.cerevisiae*, des

sites de sumoylation au niveau de résidus lysines des histones H2A, H2B et H4 ont été identifiés. La sumoylation des histones est impliquée dans un processus de répression transcriptionnelle. En effet, une forte sumoylation des résidus lysines au niveau des régions télomériques est observée comparé aux régions chromosomiques internes ou aux gènes transcrits. De plus une relation dynamique entre sumoylation et acétylation a été mise en évidence. En effet, la réduction de la sumoylation des histones entraîne une augmentation de l'acétylation.

3. Le code histone et la signification fonctionnelle des marques

Le code histone (Jenuwein et Allis 2001) établit un lien direct entre la modification de certains résidus et l'état transcriptionnel de la chromatine. Au sein d'un même nucléosome, différentes modifications post-traductionnelles peuvent être présentes simultanément sur une ou plusieurs extrémités N-terminales des histones. Une modification d'histone peut elle-même en influencer une autre de manière synergique ou antagoniste. Différentes modifications post-traductionnelles peuvent donc coexister et forment un code capable de modifier l'expression de certains gènes à un moment donné du cycle cellulaire ou en réponse à un stimulus externe et réguler ainsi différentes activités du génome. Afin de permettre la lecture du code des histones, il existe des domaines protéiques capables de reconnaître de manière spécifique les modifications post-traductionnelles des histones.

- ✓ Les protéines à bromodomaine sont les seules à reconnaître spécifiquement les lysines acétylées du domaine amino-terminal des histones et permettent ainsi le recrutement de complexes protéiques tels que des facteurs de transcription sur les régions de chromatine hyper-acétylées (Hassan et al. 2002).
- ✓ Les protéines à chromodomains ont été initialement identifiées comme domaine commun entre deux protéines, HP1 (heterochromatin protein 1) et Polycomb, régulant la structure chromatinienne chez la Drosophile (Paro et Hogness 1991) et capable de lier respectivement les lysines méthylées 9 et 27 de la queue amino-terminale de l'histone H3 (Min, Zhang, et Xu 2003); (Nielsen et al. 2002). Chez la levure *S. cerevisiae*, seulement trois protéines à chromodomaine ont été identifiées dont deux se retrouvent dans le complexe histone acétyltransférase NuA4 (Esa1 et Eaf3). Il existe également d'autres domaines de reconnaissance des résidus méthylés tels que les protéines à motifs WD répétés formés de répétitions d'environ 35 aa se terminant souvent par des résidus tryptophane (W) et aspartate (D), les protéines à domaine

Tudor, et les protéines à domaine PHD (Plant Homeodomain). Chez *S. cerevisiae*, la protéine Rad9 possède un domaine Tudor. Elle est recrutée au niveau de la chromatine lors d'un dommage à l'ADN, interagit avec la lysine H3K79 et participe à la réponse aux dommages de l'ADN (Wysocki et al. 2005). En 2006, la protéine Yng1 appartenant au complexe acétyltransférase NuA3 a été identifiée comme possédant un domaine PHD interagissant avec la lysine H3K4 triméthylée. Le domaine PHD semble permettre l'interaction avec la triméthylation de H3K4 et permettre ainsi le ciblage de complexes au niveau de la chromatine.

Trois domaines de reconnaissance des résidus phosphorylés ont été identifiés. Les protéines à domaine 14-3-3 très conservées entre les espèces interagissent avec la sérine H3S10 phosphorylée (Macdonald et al. 2005) et faciliteraient l'acétylation et l'activation de gènes en réponse à un stress (Walter et al. 2008). D'autres protéines impliquées dans la reconnaissance des résidus phosphorylés portent un domaine dit BRCT (BRCA1 C-Terminus). Initialement décrit chez la protéine BRCA1 (Breast Cancer protein 1), ce domaine est retrouvé seul ou en tandem dans les protéines impliquées dans la signalisation des dommages à l'ADN (Bork et al. 1997). En plus de son domaine Tudor, la protéine Rad9 chez *S. cerevisiae* présente un domaine BRCT en tandem impliqué dans l'interaction de la protéine avec le résidu H2AS129 phosphorylé par les kinases Tel1 et Mec1 suite à des dommages à l'ADN, renforçant la notion d'un lien entre les dommages à l'ADN et la signalisation par phosphorylation (Hammet et al. 2007).

II. La méthylation de H3K4 et le complexe Set1 chez *Saccharomyces cerevisiae*

Comme décrit dans la partie précédente, l'HMT Set1 appartient à la famille SET1 et catalyse la mono-, di- et triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3. Set1 est la sous-unité catalytique d'un complexe protéique composé de huit protéines dont cinq d'entre elles sont nécessaires à l'activité HMT spécifique de H3K4 (Dehé et Géli 2006). La délétion de *SET1* conduit à des effets pléiotropiques tels que des défauts de la structure et de la fonction des télomères, de la méiose, de la transcription de certains gènes et de la réparation de l'ADN. Cette partie détaillera les diverses implications de Set1 dans ces processus cellulaires et moléculaires.

1. Organisation et assemblage du COMPASS

L'HMT Set1 est une grosse protéine qui porte, en plus de son domaine catalytique SET en C-terminal, un motif conservé de reconnaissance de l'ARN (RRM). Les domaines SET et RRM sont conservés chez les gènes orthologues de la levure à l'humain. Set1 fait partie d'un complexe macromoléculaire appelé COMPASS (Complex of proteins associated with Set1) très conservé chez les Eucaryotes. Ce complexe de huit sous-unités inclut les protéines Swd1, Swd2, Swd3, Bre2, Sdc1, Spp1 et Sgh1 (*Figure 50*) (Roguev et al. 2001) (Miller et al. 2001) (Nagy et al. 2002). Seule la protéine Swd2 est essentielle à la viabilité cellulaire du fait de son rôle dans le complexe de clivage et de polyadénylation de l'ARNm (Cheng et al. 2004); (Dichtl et al. 2004); (Roguev et al. 2004).

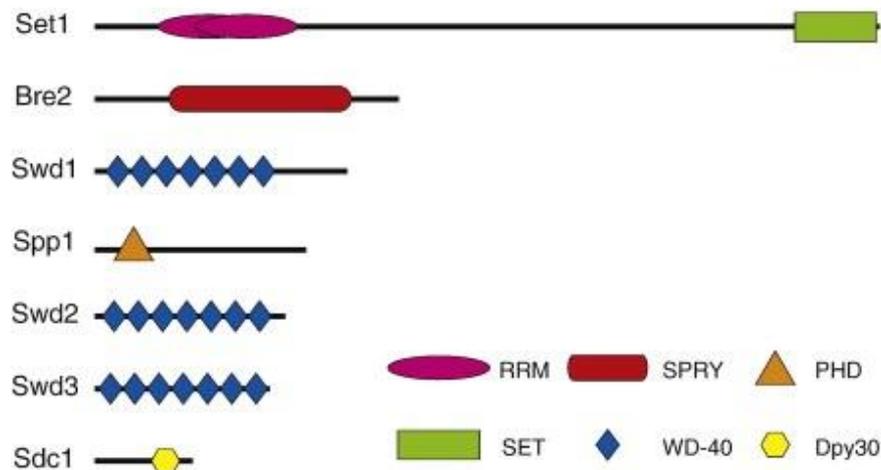


Figure 50 Représentation des différents domaines structuraux des protéines associées dans le complexe Set1. La sous-unité catalytique Set1 possède un domaine RRM de reconnaissance de l'ARN dans sa région amino-terminale ainsi que le site catalytique SET dans sa région carboxy-terminale. Bre2 possède un domaine d'interaction protéique qui n'est pas impliqué dans l'interaction avec Sdc1. Les protéines Swd1, Swd2 et Swd3 possèdent des domaines WD répétés nécessaires à leur interaction avec les formes H3K4me2. La protéine Spp1 possède un domaine PHD impliqué dans l'interaction de la protéine avec les formes di- et triméthylées de H3K4. La protéine Sdc1 possède en région C-terminale un domaine Dpy-30 nécessaire à l'interaction avec Bre2 (Murton et al. 2010).

Le "core" du complexe Set1 est composé de la sous-unité catalytique Set1 qui sert de plateforme pour l'ensemble des sous-unités du Compass (Dehé et al. 2006). Set1 est associée aux protéines Swd1 et Swd3 qui possèdent des domaines WD répétés (domaines d'interaction avec les résidus méthylés) décrits précédemment. En absence de SET1 les protéines Swd1 et Swd3 restent associées aux autres sous-unités et contribuent ainsi à la stabilité du complexe Set1 (Morillon et al. 2005) (Roguev et al. 2001) (Schneider et al. 2005). Swd1, mais pas Swd3 interagit avec H3K4me2. Les protéines Swd1 et Swd3 ont été co-exprimées chez la bactérie *E.coli* et leur purification met en évidence un complexe hétérodimérique stable, qui se dissocie après la fixation de Swd1 sur H3K4me2 (Murton et al. 2010). Cet hétérodimère interagit avec la région C-terminale de Set1 mais de façon indépendante de son domaine SET (Halbach et al. 2009).

La protéine Spp1 contient un domaine PHD qui médie une interaction avec les formes di- et triméthylées de H3K4 (Shi et al. 2007) (Dehé et al. 2006) (Murton et al. 2010). Un domaine d'interaction avec l'ADN a également été identifié dans la région C-terminale de Spp1 mais sa fonction reste inconnue (Murton et al. 2010). Spp1 interagit avec le domaine N-SET de Set1 (Halbach et al. 2009) et la délétion de *SPP1* conduit à une instabilité de la protéine Set1 (Dehé et al. 2006). Un domaine d'interaction avec l'ADN a également été identifié dans la région C-terminale de Spp1 mais sa fonction reste inconnue (Murton et al. 2010).

Les protéines Bre2 et Sdc1 interagissent entre elles. Des expériences de double hybrides menées chez la bactérie au laboratoire ont mis en évidence une interaction entre Bre2 et la région C-terminale de Set1, interaction dépendante du domaine SET de Set1. La délétion de *BRE2* abolit quant à elle l'interaction de Sdc1 avec Set1 (Dehé et al. 2006). La protéine Bre2 possède un domaine SPRY initialement identifié sur une protéine à activité tyrosine kinase (**SpIA**) ainsi que sur un récepteur de la ryadonine (**RyR**) chez les mammifères. Ces domaines sont impliqués dans des interactions protéiques au niveau de séquences riches en résidus asparagines. Une séquence similaire a aussi été identifiée dans la région amino-terminale de Sdc1 mais sa délétion, tout comme celle du domaine SPRY de Bre2 n'altère pas l'interaction entre Sdc1 et Bre2 (South et al. 2010). Une autre région de Sdc1, appelée Dpy-30, un domaine initialement identifié dans les protéines DPY-30 nécessaires à la détermination sexuelle chez *Caenorhabditis elegans*, serait impliqué dans les interactions protéine/protéine. La délétion du domaine Dpy-30 abolit l'interaction de Sdc1 avec Bre2. L'étude de formes tronquées de Bre2 a permis de déterminer une région C-terminale de Bre2 nécessaire à l'interaction avec le domaine Dpy-30 de Sdc1 (South et al. 2010). Cette région très conservée de la levure jusqu'à l'homme a été nommée SDI (Sdc1 Dpy-30 Interaction). L'expression de la protéine Sdc1 chez la bactérie a permis de mettre en évidence sa dimérisation de façon dépendante au résidu cystéine présent en position 47. Ceci n'a pas pu être observé *in vivo* chez *S. cerevisiae* (South et al. 2010). Un modèle selon lequel le complexe Set1 pourrait se dimériser *via* la dimérisation de Sdc1 a été proposé par l'équipe de Vincent Géli (Dehé et Géli 2006) (*Figure 51*).

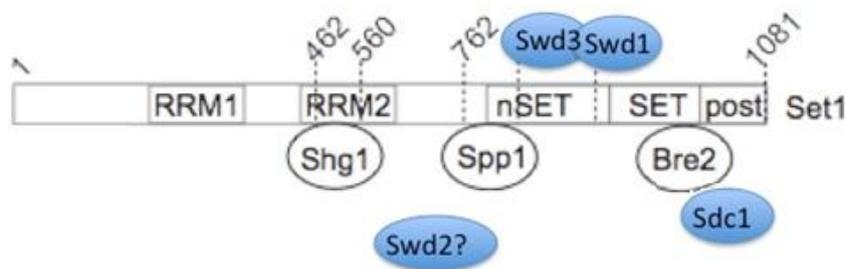


Figure 51 Représentation de la structure du complexe Set1. *Set1* sert de plate-forme pour le recrutement des protéines du Compass. RRM1 et RRM2 constituent le double domaine RRM (Trésaugues et al. 2006). Les régions d'interaction entre *Set1* et les sous-unités du Compass sont représentées sur le schéma (Dehé et al. 2006) (Halbach et al. 2009). La zone d'interaction entre *Set1* et *Swd2* n'est pas connue.

2. Distribution de la méthylation de H3K4 le long des gènes

Set1 étant la seule HMT à catalyser la mono-, di- et triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3, sa délétion abolit toutes formes de méthylation de ce résidu. La méthylation de H3K4 par Set1 est dépendante de l'ubiquitination de H2BK123.

Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que Set1 s'associe préférentiellement au niveau des régions 5' des gènes transcrits par l'ARN polymérase II (Ng et al. 2003) (*Figure 52*). Le complexe Paf1 (Polymerase associated factor 1), composé des protéines Paf1, Ctr9, Cdc73, Rtf1 et Leo1 s'associe à l'ARN polymérase II afin de transcrire les ARNm des gènes codants. Le COMPASS ainsi que le complexe Rad6/Bre1 interagissent avec le complexe Paf1 de façon dépendante des sous-unités Ctr9 et Rtf1 respectivement, et participent à la transition entre l'initiation et l'élongation. En effet, la délétion de *CTR9* abolit l'interaction du COMPASS avec le complexe Paf1, ce qui se traduit par un défaut de méthylation de H3K4. De la même façon, la délétion de *RTF1* abolit l'interaction du complexe Rad6/Bre1 avec le complexe Paf1 entraînant à la fois un défaut d'ubiquitination de H2BK123 et de méthylation de H3K4 (Wood et al. 2003).

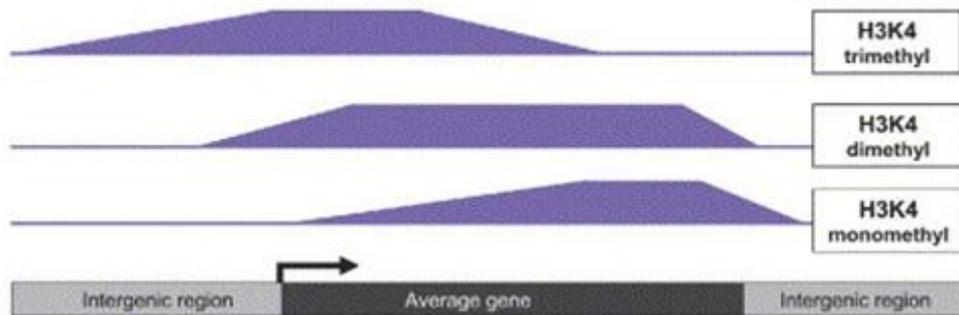


Figure 52 Distribution des différentes formes de H3K4 le long des gènes transcrits par la polymérase Pol II chez *S. cerevisiae*. La triméthylation de H3K4 prédomine au niveau des régions 5' des gènes transcrits alors que la diméthylation occupe le corps de la région codante. La monométhylation est quant à elle enrichie au niveau des régions 3'.

3. Rôle des sous-unités du COMPASS dans la régulation de la méthylation

Afin de mieux comprendre le rôle de l'ubiquitination de H2BK123 dans la régulation de la méthylation de H3K4, l'activité méthylase du COMPASS, purifié à partir de cellules sauvages et de cellules *rad6Δ* déficientes pour l'ubiquitination de H2BK123, a été testée *in vitro*. Alors que le COMPASS issu des cellules sauvages est capable de mono-, di- et trimétyler H3K4 *in vitro*, celui issu des cellules *rad6Δ* est seulement capable de

monométyler H3K4 (Dehé et al. 2005). Des études chromatographiques ont mis en évidence une instabilité du COMPASS dans les cellules déficientes pour la mono-ubiquitination de H2B. En effet, l'association de Swd2 avec le COMPASS est sévèrement affectée en absence de H2BK123 ubiquitiné. Des expériences de ChIP au niveau de gènes constitutivement actifs (GAL, ADH1, PHO84) montrent que l'interaction de Swd2 avec la chromatine est dépendante de la mono-ubiquitination de H2B (Lee et al. 2007). Une étude apporte des résultats contradictoires et montre que le complexe Rad6/Bre1 est capable d'ubiquitiner Swd2 sur les résidus lysines K68 et K69 (Vitaliano-Prunier et al. 2008). La mutation de ces lysines en arginines non ubiquitinables affecte la triméthylation de H3K4 dans les régions 5' des gènes actifs. Bien que moins important, un effet significatif des mutations est observé sur la diméthylation de H3K4 alors que la répartition de H3K4 monométhylés le long des gènes reste inchangée. En revanche, dans les mutants *swd2-K68,69R* et *H2B-K123R*, le recrutement de Swd2 sur la chromatine ainsi que son interaction avec le COMPASS ne sont pas affectés. De plus, alors que Spp1 interagit spécifiquement avec les formes di- et triméthylées de H3K4 dans des cellules sauvages, les mutations *K68,69R* affectent fortement le niveau de Spp1 lié aux extrémités 5' des gènes actifs. Ces résultats indiquent que l'ubiquitination de Swd2 permet la triméthylation de H3K4 en facilitant ou en stabilisant l'interaction de Spp1 avec le gène transcrit. Un modèle selon lequel Swd2 participe au recrutement du COMPASS sur la chromatine à travers sa capacité à interagir directement avec les histones H3 non modifiées est proposé. Le recrutement du complexe Rad6/Bre1 au niveau de l'histone H2B conduit à la fois à l'ubiquitination de H2BK123 et à celle des lysines K68 et K69 de Swd2, modification qui contrôle le recrutement de Spp1 à la chromatine, sous-unité du COMPASS nécessaire à la triméthylation de H3K4 (Vitaliano-Prunier et al. 2008) (*Figure 53*).

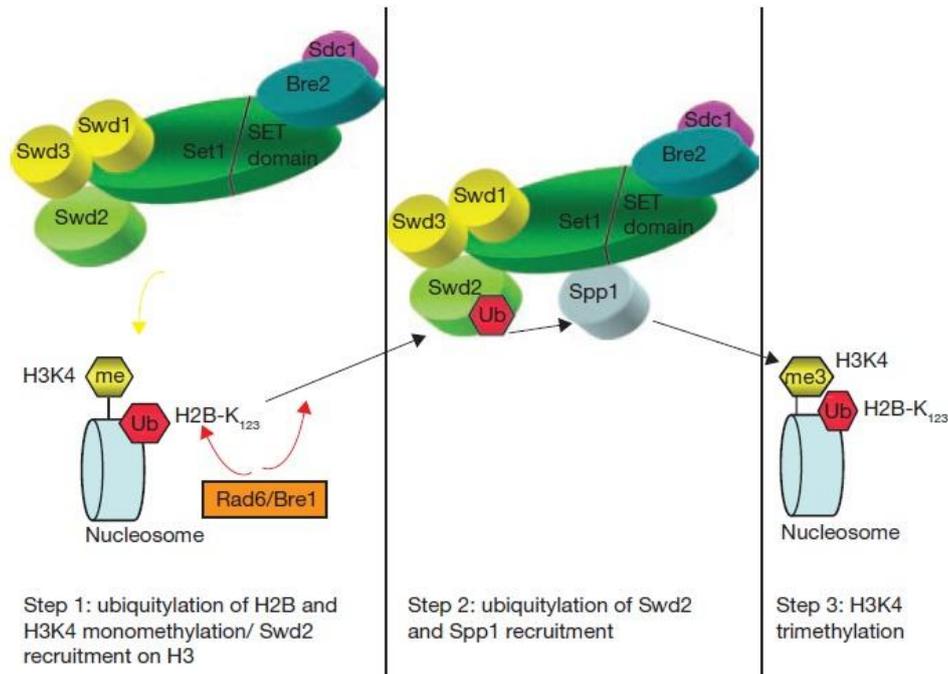


Figure 53 Modèle illustrant le rôle de l'ubiquitination de H2B et Swd2 dans le recrutement du COMPASS à la chromatine. *Swd2* est capable d'interagir avec les histones H3 non modifiées. Le recrutement du complexe Rad6/Bre1 dépendant de H2BK123 entraîne l'ubiquitination de H2BK123 et SWD2K68,69. Cette modification permet le recrutement de *Spp1* à la chromatine, sous-unité du COMPASS nécessaire à la triméthylation de H3K4. *Shg1* n'est pas représenté sur ce modèle (Vitaliano-Prunier et al. 2008).

Comme décrit précédemment, le COMPASS est un complexe très conservé chez les Eucaryotes dont les sous-unités régulent les différents types de méthylation de H3K4. Plusieurs études ont montré que la triméthylation de H3K4 était abolie dans les cellules *bre2Δ* et *sdc1Δ* et la diméthylation significativement réduite (Morillon et al. 2005) (Nagy et al. 2002) (Roguev et al. 2001) (Schneider et al. 2005) (Dehé et al. 2006). En effet, dans les cellules déficientes pour les gènes *BRE2* ou *SDC1*, on observe localement une forte diminution de la triméthylation de H3K4 au niveau des régions 5' des gènes codant ainsi qu'une diminution de la diméthylation au niveau des régions 3'. Dans un mutant *spp1Δ*, seule la triméthylation est affectée au niveau des régions 5' des gènes codant (Dehé et al. 2006).

En résumé les sous-unités du complexe Set1 peuvent être groupées en trois classes. (a) l'hétérodimère Swd1/Swd3, essentiel à la stabilité de Set1, à l'intégrité du complexe et donc à la méthylation de H3K4; (b) l'hétérodimère Sdc1/Bre2 qui n'est pas nécessaire à l'intégrité du complexe mais stimule l'activité catalytique de Set1 et (c) Spp1 impliqué dans la stabilité de Set1 ainsi que dans la triméthylation de H3K4. (Ng et al. 2003) (Schneider et al. 2005) (Dehé et al. 2006) (Halbach et al. 2009).

III. Rôle de la méthylation de H3K4

1. Rôle de la méthylation de H3K4 dans la régulation de la transcription

La méthylation de H3K4 est l'une des caractéristiques universelles de la chromatine active chez l'ensemble des eucaryotes. Alors que la triméthylation marque les régions codantes précoces, la diméthylation est associée aux régions récemment transcrites par Pol II. La monométhylation est elle présente majoritairement à la fin des gènes. Le premier rôle de la méthylation de H3K4 a été décrit en 2003 par Santos-rosa et ses collaborateurs. Ils observèrent que Isw1, facteur de remodelage de la chromatine à activité ATPase dépend de la méthylation de H3K4 pour s'associer à la chromatine et proposèrent que l'activité enzymatique de Set1 associée à celle de Isw1 génère des changements spécifiques de la chromatine permettant le positionnement correct de Pol II (Santos-Rosa et al. 2003). De plus, seule la monométhylation de H3K4 semble nécessaire à l'association de Isw1. Deux ans plus tard, Morillon et ses collaborateurs démontrèrent que lors de la transcription, la triméthylation de H3K4 ainsi que la méthylation de H3K36 dépendante de Set2 permettent le recrutement de l'acétyltransférase Esa1 appartenant au complexe NuA4, au niveau des promoteurs des gènes, menant ainsi à l'acétylation de la lysine 8 de l'histone H4. Ceci permettrait le recrutement du complexe SWI/SNF qui par un remodelage des nucléosomes de la région 5' favoriserait l'élongation de la transcription marquée par l'apparition de H3K4me2 et H3K79me2 (Morillon et al. 2005).

Les études de l'expression des gènes à l'échelle du génome menées chez *S. cerevisiae* apportent des résultats controversés. Deux d'entre elles décrivent une diminution globale de l'expression des gènes en l'absence de Set1. La première montre une corrélation entre l'acétylation des histones H3 et H4 dans les régions promotrices des gènes actifs et l'activité transcriptionnelle et propose que Set1 serait nécessaire au maintien de l'expression des gènes actifs présentant un promoteur acétylé et une région codante méthylée (Bernstein et al. 2002). La deuxième étude montre que l'absence de Set1 entraîne une diminution de la transcription d'environ 80% des gènes chez *S. cerevisiae* due à des modifications de la structure de la chromatine (Boa et al. 2003). Cependant, en contradiction apparente avec ces résultats, une autre étude montre que la délétion de *SET1* entraîne une augmentation de l'expression de 200 gènes, dont la majorité sont localisés dans les régions proches des télomères (Venkatasubrahmanyam et al. 2007).

Afin de mieux comprendre le rôle de la méthylation de H3K4 dans la régulation de la transcription, nous avons entrepris une étude en collaboration avec les laboratoires de Franck Holstege et Catherine Dargemont. Alors que les études précédentes étudiaient l'effet de la perte des trois états de méthylation de H3K4 à travers la délétion de *SET1* ou la substitution de résidu lysine H3K4 en arginine, nous avons étudié séparément les rôles de la mono-, di- et triméthylation de H3K4 en utilisant différents mutants du COMPASS. En effet, la délétion de *SET1*, *SWD1* et *SWD3* abolit les trois états de méthylation de H3K4. La délétion de *BRE2* ou *SDC1* entraîne une perte complète de H3K4me3 ainsi qu'une diminution significative de H3K4me2, alors qu'aucun changement n'est observé pour la monométhylation. La délétion de *SPP1* ainsi que le mutant non ubiquitinable *swd2-K68,69R* décrit précédemment, présentent seulement une forte diminution de H3K4me3. A partir de ces différentes souches, le laboratoire de Franck Holstege a réalisé une série de transcriptomes. Les résultats obtenus indiquent que l'atténuation de la triméthylation dans les mutants *spp1Δ* et *swd2-K68,69R* n'entraîne pas de réels changements de l'expression génique. En revanche, la majorité des changements sont observés dans les mutants *set1Δ*, *swd1Δ*, *swd3Δ*, *bre2Δ* et *sdc1Δ* dont les profils d'expression sont très similaires. Cette étude a permis l'identification de 69 gènes présentant une augmentation significative de leur niveau de transcription, dans au moins deux des souches mutantes étudiées (*Figure 54*).

Ces résultats indiquent que la méthylation de H3K4 serait associée à la répression transcriptionnelle et se limiterait à quelques gènes. La répartition de la méthylation le long de ces gènes réprimés par le COMPASS révèle la présence inhabituelle d'un enrichissement en di- et triméthylation en 3' de la région codante (*Figure 55*).

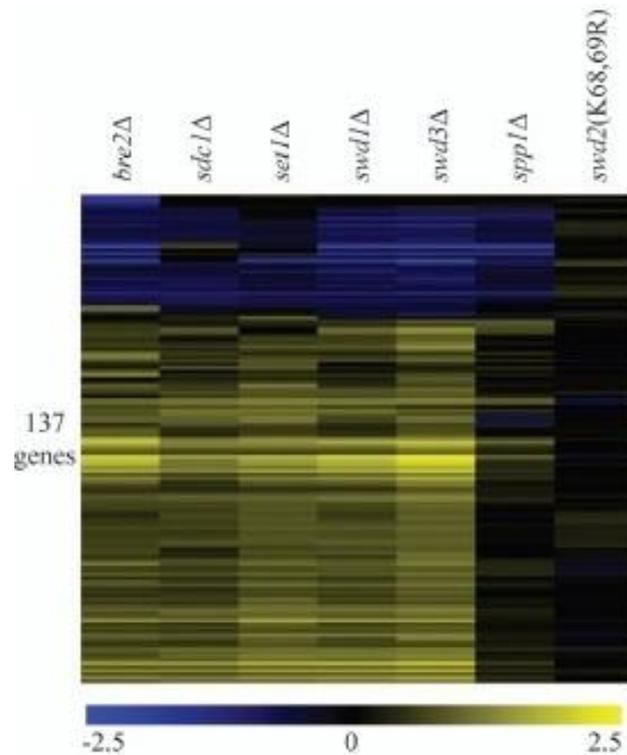


Figure 54 Transcriptome représentant les changements significatifs d'expression des ARNm dans différents mutants du COMPASS. La variation de l'expression des ARNm des différents mutants comparé au sauvage est indiquée par le code couleur.

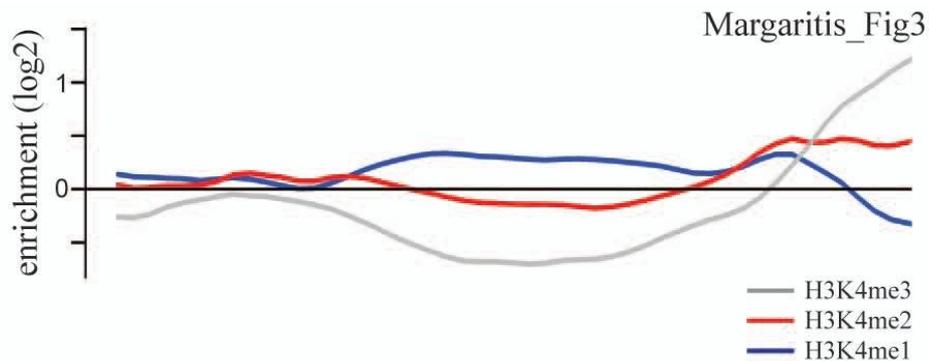


Figure 55 Profil de répartition des différentes formes de méthylation de H3K4 le long des gènes réprimés par le COMPASS. Une majorité de ces gènes présente une tri-méthylation en 3' suggérant l'existence de transcription antisens initiée dans la région 3' de ces gènes.

L'un des gènes réprimés par le COMPASS, *PHO84*, est régulé par des transcrits anti-sens initié en 3' (Camblong et al. 2007) (Camblong et al. 2009). Pour tester l'hypothèse selon laquelle la transcription anti-sens pourrait être impliquée dans le mécanisme de répression lié au COMPASS, la présence de transcrits anti-sens a été caractérisée et quantifiée par

transcription inverse et PCR quantitative. Les résultats obtenus montrent que le taux de transcrits anti-sens chute dès que la triméthylation de H3K4 est affectée, montrant que la triméthylation de H3K4 permet de promouvoir la transcription anti-sens. Afin de déterminer si l'expression des gènes est influencée par la production d'ARN anti-sens, un transcriptome dans un mutant *rrp6Δ* présentant une accumulation des ARN anti-sens a été réalisé. Cette étude montre que l'expression des gènes réprimés par le COMPASS n'est pas modifiée dans les cellules *rrp6Δ*. La production des ARN anti-sens n'est donc pas quantitativement corrélée à l'expression du gène qu'il superpose. Seuls deux gènes, *PHO84* et *VTC3* voient leur expression diminuée lors de l'accumulation de leurs ARN anti-sens dans le mutant *rrp6Δ*, mais la délétion de *SET1* annule cette accumulation et restaure totalement ou en partie l'expression de ces gènes. Ces données sont cohérentes avec le mécanisme d'interférence ADN/ARN récemment proposé (Camblong et al. 2009). Notre étude a permis de mettre en évidence un rôle distinct de la di- et triméthylation de H3K4 dans deux mécanismes de répression transcriptionnelle. Les enrichissements en di et triméthylation de H3K4 en 3' des gènes participent distinctement à cette répression. La triméthylation semble favoriser la transcription anti-sens de ces gènes et ainsi, le complexe Set1 participe à la répression transcriptionnelle des gènes régulés par leur ARN anti-sens tels que les gènes *PHO84* et *VTC3*. Pour la majorité des autres gènes réprimés par le COMPASS, un second mécanisme intervient, mécanisme dans lequel la diméthylation de H3K4 pourrait recruter des déacétylases et favoriser la déacétylation des promoteurs par un mécanisme qui reste à définir. Les résultats de cette étude à laquelle j'ai participé ont donné lieu à un manuscrit en cours de de révision à PlosGenetics qui est présenté en "annexes".

2. Rôle de Set1 dans la méiose

Chez *S. cerevisiae* comme chez les Eucaryotes supérieurs, la recombinaison génétique lors de la méiose débute par la formation de coupures double-brins de l'ADN, générées par la protéine topoisomérase Spo11. Ce processus nécessite en plus de la protéine Spo11, au moins dix autres protéines. Ces cassures sont formées après la réplication méiotique et préférentiellement en certains endroits spécifiques du génome appelés points chauds principalement localisés dans les régions inter-géniques. La délétion de *SET1* dans des cellules diploïdes provoque un défaut de sporulation (Nislow et al. 1997). Une étude menée au laboratoire a mis en évidence un rôle de Set1 durant la méiose à la fois dans la réplication et la formation des cassures double-brins de l'ADN (Sollier et al. 2004). En effet, la délétion

de *SET1* entraîne un retard de l'entrée des cellules en phase S lors de la réplication méiotique, du à un défaut d'initiation de la réplication. De plus, l'absence de Set1 affecte la formation des cassures double-brins de l'ADN au niveau de différents points chauds de recombinaison. Ce défaut n'est pas lié au délai de réplication méiotique des cellules *set1Δ* ni à des défauts d'expression de Spo11 ou de ses partenaires. Ces observations suggèrent que la méthylation de H3K4 pourrait réguler les cassures de l'ADN dépendantes de Spo11 durant la méiose (Sollier et al. 2004). En faveur de cette hypothèse, il a été récemment montré que les sites de cassures double-brins de l'ADN au niveau des points chauds sont enrichis en H3K4 triméthylé et que le niveau de H3K4me3 diminue avec l'augmentation de la distance du site de coupure. De plus, en absence de Set1, 84% des sites de cassures disparaissent, de façon corrélée avec le niveau de triméthylation de H3K4, montrant que H3K4me3 est une marque pré-existante des sites de recombinaison méiotiques (Borde et al. 2009).

3. Rôle de la méthylation de H3K4 dans la réparation des dommages à l'ADN.

Des expériences de double-hybride menées au laboratoire ont mis en évidence une interaction directe entre le domaine SET de Set1 et la région C-terminale de la protéine Mec3 intervenant dans les voies de signalisation des dommages à l'ADN (Corda et al. 1999). De plus, la délétion de *SET1* s'avère restaurer la viabilité du mutant *mec3Δ* après traitement aux UV ou après irradiations. En revanche, la délétion de *SET1* ne semble pas avoir d'effet sur le défaut de progression des cellules à travers le cycle cellulaire des cellules *mec3Δ* après induction de dommages à l'ADN par traitement MMS. Des observations similaires ont été réalisées dans les cellules *mec1Δ*, *rad17Δ* et *rad24Δ* (Corda et al. 1999) (Schramke et al. 2001). De façon surprenante, la délétion de *SET1* n'affecte pas la sensibilité d'un mutant *rad53* dépourvue d'activité kinase (*rad53K227A*). De plus, l'inactivation de Set1 entraîne une hyperphosphorylation de Rfa2 dépendante de Rad53 et indépendante de Mec1 et Tel1, les deux kinases connues pour phosphoryler RPA (Schramke et al., 2001). Le mécanisme par lequel la délétion de *SET1* conduit à la phosphorylation de Rfa2 par Rad53 reste méconnu.

SET1 semble interférer avec certains gènes impliqués dans la voie de signalisation des dommages à l'ADN mais le rôle de Set1 dans ce processus reste à définir. En 2010, Faucher et Wellinger mettent en évidence un rôle direct de Set1 dans la réparation des dommages à l'ADN par NHEJ. L'absence de *SET1* ou l'absence de méthylation de H3K4 (*H3K4R*) entraîne un défaut de recrutement de l'hétérodimère yKU à l'origine du défaut de la voie NHEJ. Set1 et

MRX sont tous deux recrutés au niveau d'une CDB de façon dépendante au complexe de remodelage RSC. La létalité du double mutant *mrx set1Δ* montre que Set1 et MRX agissent dans deux voies indépendantes nécessaires au passage des cellules à travers la phase S en présence de dommages à l'ADN (Faucher et Wellinger 2010).

4. L'effet de position au télomère et la régulation de la taille des télomères

Chez *S. cerevisiae*, l'hétérochromatine est formée au niveau des loci de changement de type sexuel *HML* et *HMR*, des télomères et de l'ADNr. Dans ces régions, l'extinction des gènes fait intervenir les protéines Sir2, Sir3 et Sir4 (Gasser et Cockell 2001). Au niveau des télomères, le complexe SIR est recruté par la protéine Rap1 fixée sur les répétitions télomériques ainsi que par l'hétérodimère KU (Luo, Vega-Palas, et Grunstein 2002). Les queues des histones H3 et H4 dans les régions adjacentes aux télomères sont hypoacétylées de façon dépendante à l'HDAC Sir2 (Gottschling 2000). Ces histones hypoacétylées sont préférentiellement liées par le complexe SIR. En plus d'être hypoacétylées, les résidus H3K4 et H3K79 hypométhylés, permettent également la fixation préférentielle des protéines SIR (Bernstein et al. 2002); (Ng et al. 2003) (Santos-Rosa et al. 2004). La formation et le maintien de ces régions hypométhylées au niveau des télomères serait initiés par la fixation de Sir4 au niveau des protéines Rap1 de façon indépendante des protéines Sir2, Sir3 et yKu70/80 proches du télomère. Un complexe formé par les protéines Sir2, Sir3 et Sir4 dépendant de KU pourrait ensuite s'étendre le long du chromosome. Durant cette phase, la déacétylation des histones par Sir2 favoriserait la fixation du complexe SIR sur les histones entraînant une inhibition partielle de la transcription et ainsi une diminution de la méthylation de H3K4. De plus, le recrutement probable de la déubiquitinyase Ubp10 spécifique de H2BK123 via les protéines SIR permettrait de maintenir un faible niveau de di- et triméthylation de H3K4 (Emre et al. 2005). Le complexe SIR est ainsi responsable de l'extinction des gènes de l'hétérochromatine dans les régions sub-télomériques, événement également appelé « effet de position au télomère » ou TPE (pour Telomere Position Effect).

De façon concordante, Set1 joue un rôle clé dans l'extinction des gènes proches des télomères (Nislow et al. 1997) (*Figure 56*). Notre laboratoire a montré que Set1 était impliqué non seulement dans le TPE, mais aussi dans la régulation de la taille des télomères. En effet, la délétion de *SET1* entraîne un raccourcissement de la longueur des télomères d'environ 40 pb (Corda et al. 1999) (*Figure 57*).



Figure 56 Rôle de Set1 dans le maintien du TPE. Un test en goutte a été effectué par des dilutions successives de 10 en 10 à partir de cellules sauvages et *set1Δ*. La délétion du gène *SET1* entraîne une perte du TPE qui se traduit par l'expression complète du gène *URA3* placé proche du télomère accompagné d'une sensibilité des cellules au 5'FOA.

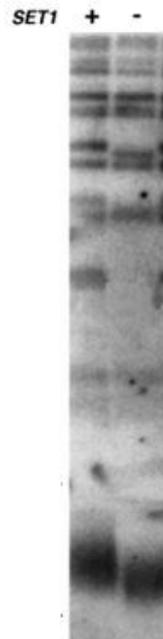


Figure 57 Rôle de Set1 dans le régulation de la taille des télomères. La longueur des télomères d'une souche sauvage et d'un mutant *set1Δ* a été mesurée par Southern blot. Après digestion de l'ADN génomique avec l'enzyme de restriction *XhoI*, les télomères ont été marqués avec une sonde TG1-3 spécifique des répétitions télomériques. La délétion de *SET1* entraîne un raccourcissement des télomères d'environ 40 pb. Ce raccourcissement peut atteindre 100 pb dans certains contextes génétiques.

Objectifs de l'étude

Durant ces dernières années, de nombreuses études ont été menées au laboratoire afin de mieux comprendre les différents rôles de l'HMT Set1. Comme nous l'avons vu précédemment, la délétion de *SET1* n'est pas létale mais provoque des phénotypes pléiotropiques. Elle affecte la croissance, l'activation de la transcription, la régulation de la longueur des télomères, l'effet de position au télomère, l'extinction des gènes au loci de l'ADNr, la différenciation méiotique, la réparation... Une partie de mon projet de thèse a consisté dans l'étude du rôle de Set1 dans le maintien de la taille des télomères. Pour cela, nous avons menée une série d'études ayant pour but de comprendre si le raccourcissement des télomères était lié à un des autres phénotypes des cellules *set1Δ*. Ce travail s'est donc déroulé en différentes étapes:

- ✓ Etude de liens entre les différents états de méthylation de H3K4 et la régulation de la taille des télomères.
- ✓ Mise en évidence d'un mécanisme indépendant de la méthylation de H3K4 dans le raccourcissement des télomères des cellules *set1Δ*.
- ✓ Etude de l'effet de la délétion de *SET1* sur la longueur des télomères de facteurs impliqués dans la régulation positive de la taille des télomères.
- ✓ Etude de l'effet de la délétion de *SET1* sur la longueur des télomères de facteurs impliqués dans la régulation négative de la taille des télomères
- ✓ Etude de l'effet de la délétion de *SET1* sur la voie de régulation de la taille des télomères par les TERRA
- ✓ Etude de l'effet du ciblage de Set1 sur un télomère.

En parallèle de ce cette étude sur la régulation de la taille des télomères par Set1 nous avons étudié son rôle dans les processus d'adaptation et de résection.

Chapitre 2:

Résultats

I. Set1 et la régulation de la taille des télomères

Comme décrit précédemment, le laboratoire a mis en évidence un rôle de Set1 dans la régulation de la taille des télomères (Corda et al. 1999). En effet, la délétion de *SET1* entraîne un raccourcissement de la longueur des télomères d'environ 50 pb mais les mécanismes moléculaires impliqués restent inconnus. Ma contribution à ce projet a été de rechercher si l'un des différents phénotypes du mutant *set1Δ* était impliqué dans le processus de raccourcissement des télomères.

Il a été observé que l'effet de la délétion de *SET1* sur la longueur des télomères était variable selon le fond génétique utilisé. Bien que le raccourcissement des télomères du mutant *set1Δ* est moins marqué dans la souche BY, nous avons choisi ce fond génétique pour une grande partie de l'étude pour différentes raisons. En effet, dans ce contexte cellulaire, la délétion de *SET1* combinée aux différents mutants étudiés entraîne un raccourcissement des télomères bien marqué permettant une étude des relations d'épistasie. De plus, la délétion de *SET1* a pu être combinée à un grand nombre de mutants dans le fond génétique BY grâce à l'utilisation de la collection Euroscarf (EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional analysis).

1. Rôle des différentes formes de méthylation de H3K4 dans la régulation de la taille des télomères

L'histone méthyltransférase Set1 catalyse la mono-, di- et triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 et nous avons vu précédemment un effet différentiel des différentes formes de méthylation notamment sur la transcription sens et anti-sens. Afin d'étudier l'effet de chacune des formes de méthylation de H3K4 sur la longueur des télomères, nous avons utilisés différents mutants du COMPASS. En effet, la délétion de *SET1*, *SWD1* et *SWD3* abolit les trois états de méthylation de H3K4. La délétion de *BRE2* ou *SDC1* entraîne une perte complète de H3K4me3 ainsi qu'une diminution significative de H3K4me2 alors qu'aucun changement n'est observé pour la monométhylation de H3K4. La délétion de *SPP1* présente seulement une forte diminution de H3K4me3. Nous avons également étudié l'effet du mutant *set1G951S* dans lequel l'activité catalytique de Set1 est globalement abolie, bien qu'une monométhylation résiduelle de H3K4 soit observée. L'effet de chacune de ces mutations dans

le fond génétique BY a été mise en évidence par Westernblot après purification des histones de chacun des mutants (*Figure 58A*).

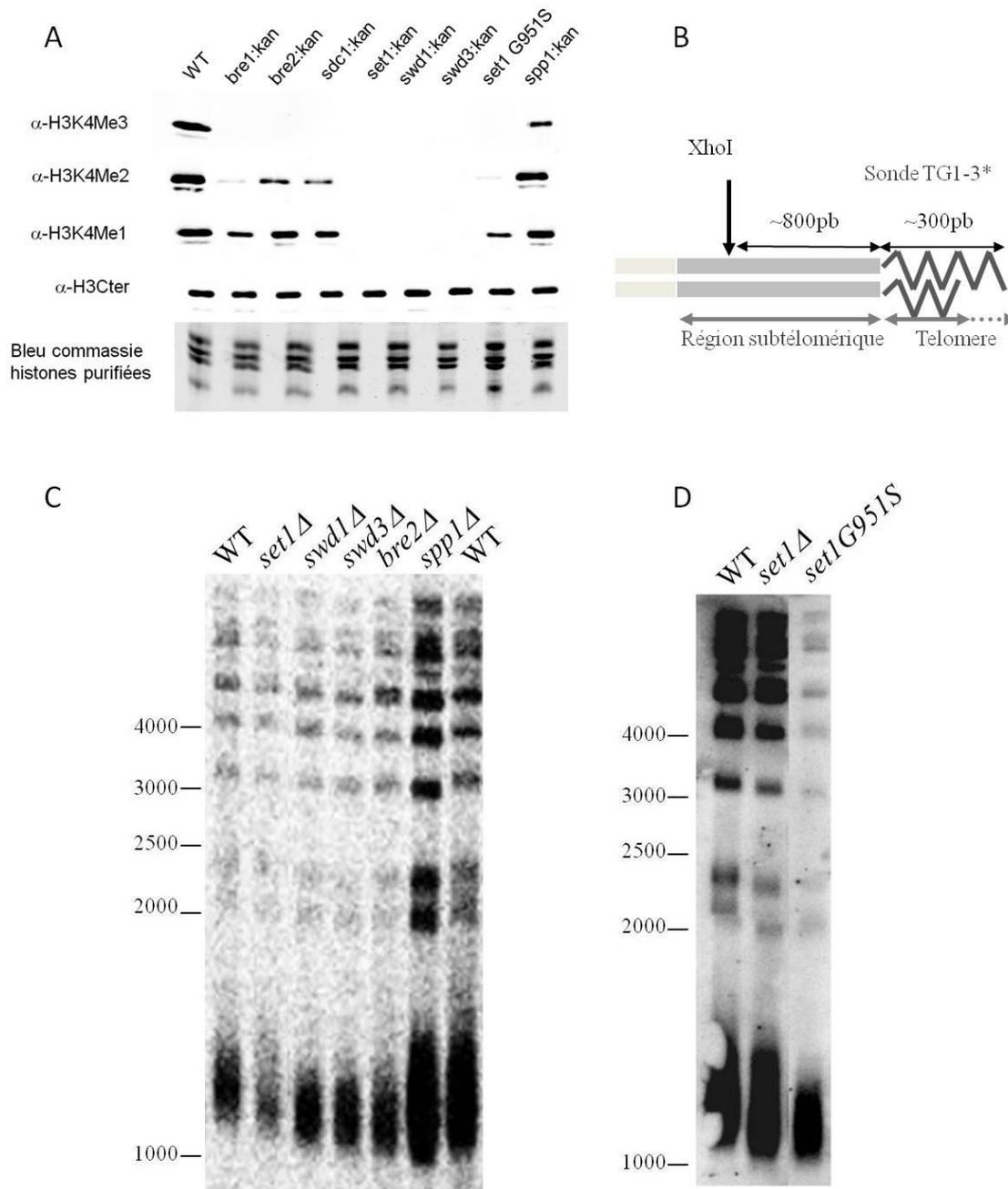


Figure 58 Effet de la di- et triméthylation de H3K4 sur la longueur des télomères. (A) La variation d'histones mono-, di- et triméthylées présentes dans les différents mutants est mise en évidence par l'utilisation d'anticorps provenant de chez Abcam. Des quantités équivalentes d'histones ont été chargées sur le gel, et sont mises en évidence grâce à la détection par l'anticorps anti-H3Cter. (B) Représentation schématique du télomère montrant la position du site de restriction XhoI et la position de la sonde TG1-3 utilisée (C) Les différents mutants du COMPASS présentent un raccourcissement de la taille des télomères d'environ 100 pb comparé à la souche sauvage. (D) Le mutant catalytique qui retient une activité résiduelle de monométhylation a des télomères similaires à ceux des cellules set1 Δ . Le Southern blot a été réalisé à partir d'un gel d'agarose 1.2%. La sonde utilisée a été purifiée à partir du plasmide sp100 digéré par l'enzyme de restriction EcoRI et marquée au dCTP- α ³²P.

La taille des télomères de chacun des mutants a été mesurée par Southern blot en utilisant une sonde TG1-3 spécifique des répétitions télomériques (*Figure 58B*). Les résultats obtenus montrent un raccourcissement des télomères d'environ 100 pb dans chacun des mutants du COMPASS comparé à la souche sauvage (*Figure 58C*). Bien qu'une activité résiduelle de monométhylation persiste dans le mutant catalytique *set1G951S*, les télomères sont similaires à ceux observés dans le mutant *set1Δ* (*Figure 58D*). Ces résultats indiquent que la délétion de chacune des sous-unités de COMPASS provoque un raccourcissement des télomères à peu près identique. Les pertes de di- et triméthylation suffisent à raccourcir les télomères. Le COMPASS et la méthylation de H3K4 ont été associés à de nombreux phénotypes. Notamment, la perte de méthylation provoque une légère délocalisation des protéines Sir du télomère vers des cibles euchromatiques dépourvues de méthylation sur H3K4 (Santos Rosa et al. 2004). D'autre part, comme je l'ai mentionné précédemment, la perte de méthylation de H3K4 entraîne aussi une dérégulation de la transcription antisens. L'idée est de relier le raccourcissement des télomères à la méthylation de H3K4, à des activités de Set1 déjà décrites, ou alors à des activités de Set1 indépendantes de son activité HMTase.

2. Implication d'un mécanisme indépendant de la méthylation de H3K4 dans la régulation de la taille des télomères

Bien que cette possibilité ait été évoquée depuis longtemps, ce n'est que récemment qu'il a été démontré que les protéines à domaine SET sont impliquées dans la méthylation de protéines autres que des histones (Chuikov et al. 2004). Set1 a été impliquée dans la méthylation de la protéine du kinétochore Dam1, et il n'est pas exclu que Set1 méthyle d'autres cibles (Zhang et al. 2005). Nous nous sommes donc demandé si la régulation de la taille des télomères par la protéine Set1 dépendait uniquement de la di- et triméthylation de H3K4 ou si la méthylation d'autres protéines pouvait entrer en jeu dans ce processus. Pour tester cette possibilité, j'ai combiné la délétion de *SET1* au mutant ponctuel *H3K4R* non méthylable et comparé la taille des télomères du double mutant *H3K4R set1Δ* au simple mutant *H3K4R* (*Figure 59*).

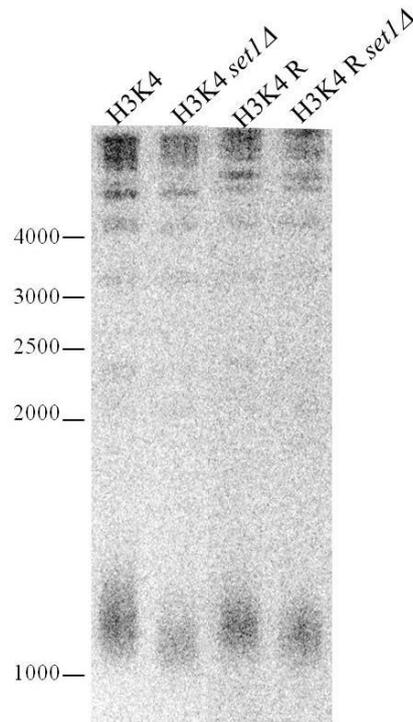


Figure 59 Le raccourcissement des télomères du mutant *set1Δ* n'est pas seulement du à la perte de méthylation de H3K4. La délétion de *SET1* dans la souche sauvage *H3K4* ou dans le mutant *H3K4R* non méthylable entraîne un raccourcissement similaire des télomères. Le Southern blot a été réalisé à partir d'un gel d'agarose 1.2%. La sonde utilisée a été purifiée à partir du plasmide *sp100* digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* et marquée au dCTP- α ³²P.

Les résultats obtenus indiquent que le raccourcissement des télomères observé dans le mutant *set1Δ* n'est pas uniquement lié au défaut de méthylation de H3K4. En effet, la délétion de *SET1* dans le mutant *H3K4R* non méthylable entraîne un raccourcissement de la taille des télomères. Ces résultats suggèrent qu'une protéine non identifiée pourrait être une cible de Set1 et que sa méthylation serait impliquée dans le processus de régulation des télomères. L'autre possibilité est que des sous-unités du complexe interfèrent avec un processus impliqué dans la régulation de la taille des télomères.

L'analyse des séquences cibles des protéines à domaine SET a mis en évidence une séquence consensus de type "R/K - S/T/A - **K** - D/K/N/Q" dans laquelle la lysine centrale est méthylée (Couture et al. 2006). L'analyse de séquence de différentes protéines chez *S. cerevisiae* a montré la présence d'une telle séquence (38-"KSKK"-41) sur la protéine Ku80. L'hétérodimère yKu70/Ku80 protège les télomères de la dégradation, recrute Est2 aux télomères en phase G1 du cycle cellulaire, *via* son interaction avec l'ARN *TLC1* de la télomérase et participe à l'activation de la télomérase en fin de phase S. Nous avons réalisé des expériences de marquage *in vivo* avec le donneur de méthyle S-adenosyl-L-[methyl-

³H]methionine (SAM) marquée au tritium suivi d'une immunoprécipitation des protéines d'intérêt dans un contexte sauvage ou *set1Δ*. Le bruit de fond de très nombreuses méthylations indépendantes de Set1 et une trop grande sensibilité de la technique, ne nous ont pas permis d'identifier de façon certaine des modifications de la protéine Ku80 (*données non montrées*). Nous nous sommes donc tourné vers une analyse génétique afin de mettre en évidence une éventuelle relation d'épistasie entre yKu70/Ku80 et Set1. Nous avons combiné la délétion de *SET1* aux mutants *ku70Δ*, ainsi qu'à l'allèle *yku80-135i* qui présente un défaut d'interaction avec l'ARN *TLC1* de la télomérase et déterminé la taille des télomères dans les cellules portant différentes combinaisons des délétions. La Figure 61A (partie 5) montre que la délétion de *SET1* entraîne raccourcissement supplémentaire des télomères dans les cellules *ku70Δ* et *yku80-135i*. Ce résultat va à l'encontre d'un rôle d'une méthylation potentielle du dimère yKu70/K80 par Set1 pour stabiliser l'interaction de KU avec l'ARN *TLC1* de la télomérase.

3. Le raccourcissement des télomères n'est pas lié à la perte du TPE du mutant *set1Δ*

Nous avons ensuite posé la question d'un effet de la perte du TPE du mutant *set1Δ* sur la longueur des télomères. Comme décrit précédemment, l'extinction des gènes fait intervenir les protéines Sir2, Sir3 et Sir4. En effet, la délétion du gène *SIR3* entraîne une perte du TPE et un raccourcissement des télomères d'environ 50 pb (Palladino et al. 1993). Le mutant *set1Δ* montre un raccourcissement similaire. Afin de déterminer si le raccourcissement des télomères du mutant *set1Δ* est lié à son défaut de TPE, nous avons délété *SET1* dans un mutant *sir3Δ* et comparé la longueur des télomères du double mutant *sir3Δ set1Δ* au simple mutant *sir3Δ* (Figure 60).

La délétion de *SET1* aggrave le raccourcissement des télomères des cellules *sir3Δ*. Ceci suggère que l'effet télomérique du mutant *set1Δ* n'est pas une conséquence de la perte de TPE. Ce contrôle est important car il a été suggéré qu'en absence de méthylation de H3K4, la protéine Sir3, qui a une préférence pour les histones non méthylées, se fixerait sur l'ensemble du génome et serait ainsi titrée des régions télomériques.

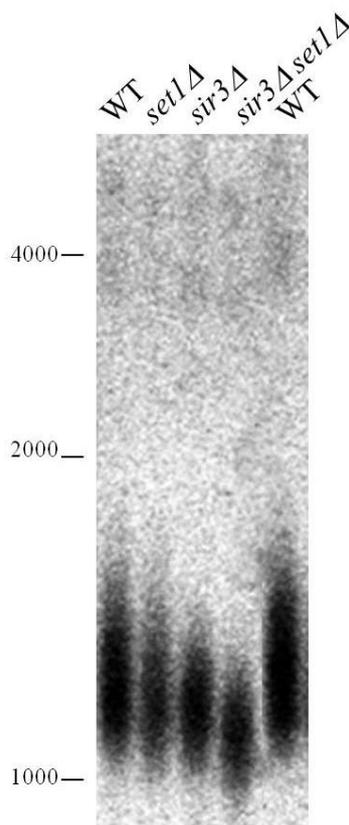


Figure 60 Le raccourcissement des télomères du mutant *set1Δ* n'est pas lié à son défaut de TPE. La délétion de *SET1* dans le mutant *sir3Δ* entraîne un raccourcissement des télomères. Le Southern blot a été réalisé à partir d'un gel d'agarose 1.2%. La sonde utilisée a été purifiée à partir du plasmide *sp100* digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* et marquée au dCTP- $\alpha^{32}P$.

4. La délétion de *SET1* aggrave le raccourcissement des télomères des mutants impliqués dans la régulation positive des télomères.

Nous avons analysé l'effet de la délétion de *SET1* dans des souches altérées pour des facteurs impliqués dans la régulation positive de la longueur des télomères.

Un lien fonctionnel a été établi au laboratoire entre *Set1* et les kinases *Mec1* (l'orthologue d'ATR) et *Rad53* (l'orthologue de Chk2) impliquées dans la surveillance des dommages de l'ADN (Schramke et al. 2001). Ces kinases sont des acteurs essentiels de la réponse de la cellule face aux dommages de l'ADN (arrêt du cycle cellulaire, induction de gènes de réparation, etc..) ainsi que de la réplication de l'ADN. La fonction essentielle de *Mec1* et de *Rad53*, chez *Saccharomyces cerevisiae*, est de promouvoir la production de déoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs) durant la phase S à travers la phosphorylation et la dégradation de l'inhibiteur *Sml1* de la ribonucléotide réductase (Zhao *et al.*, 2001). Contrairement à la sensibilité aux dommages de l'ADN, la létalité associée aux mutants *mec1* et *rad53* est abolie soit par l'élévation du niveau des dNTPs, soit par la délétion de *SML1*, soit

par la surexpression de la RNR (Zhao, Muller, et Rothstein 1998). Un rôle additionnel a été montré pour Rad53 dans la dégradation des histones en excès non empaquetées dans la chromatine (Gunjan et Verreault 2003).

Il a été montré au laboratoire que la délétion de *SET1* diminuait la sensibilité aux génotoxiques d'un mutant *mec1Δ* mais pas d'un mutant *rad53 Δ*. Il s'est avéré ensuite que les délétions de *MEC1* et *RAD53* provoquaient un léger raccourcissement des télomères (Ritchie et al. 1999). L'autre kinase impliquée dans la signalisation des dommages de l'ADN est l'orthologue d'ATM appelé Tel1. Chez *S. cerevisiae*, la délétion de *TELI* provoque un raccourcissement marqué de la longueur des télomères. Il a été proposé que Tel1 était nécessaire à la reconnaissance préférentielle des télomères courts par la télomérase (Sabourin et al. 2007) (Bianchi et Shore 2007) (Hector et al. 2007) (Arnerić et Lingner 2007). De façon intéressante, la double délétion *MEC1 TELI* abolit l'activité de la télomérase (Ritchie et al. 1999). Il a aussi été montré qu'un double mutant *set1Δ mre11Δ* avait une croissance affectée (Faucher et Wellinger 2010). Comme nous l'avons indiqué, le complexe MRX est impliqué dans le processus de résection du brin télomérique 5', recrute Tel1, et de ce fait contrôle le recrutement de la télomérase aux télomères. La délétion de *MRE11* entraîne un raccourcissement de la longueur des télomères équivalent à celui de Tel1, et à celui du double mutant *mre11Δ tel1Δ* (Ritchie et Petes 2000b).

Nous avons donc étudié l'effet de la délétion de *SET1* sur la longueur des télomères dans les mutants *sml1Δmec1Δ*, *tel1Δ*, dans le mutant catalytique *rad53K227A* ainsi que dans des combinaisons de ces différents mutants (*Figure 61A et B*). Les résultats indiquent que la délétion de *SET1* réduit la taille des télomères de chacun des mutants. Notamment les télomères des double mutants *tel1Δ set1Δ* et *mre11Δ set1Δ* sont très courts, à la limite de la taille critique induisant la sénescence. Le résultat le plus surprenant de cette étude est le phénotype du quadruple mutant *sml1Δ mec1Δ tel1Δ set1Δ*. Contrairement au mutant *sml1Δ mec1Δ tel1Δ*, ce mutant ne senesce pas. Dans cette étude, nous n'avons pas obtenu le mutant *sml1Δ mec1Δ tel1Δ*. Le mutant *sml1Δ mec1Δ tel1Δ set1Δ* a une croissance lente, des télomères très courts mais ne montre pas de phénotype de sénescence. Cela est surprenant car la délétion de *set1Δ* induit un raccourcissement de l'ensemble des mutants testés pour l'instant. Nous allons voir dans le paragraphe suivant que l'inactivation de Set1 allonge les télomères dans des mutants de régulateurs négatifs de la télomérase.

Nous avons étudié ici l'effet de la délétion de *SET1* dans des mutants de différentes protéines dont la délétion entraîne un raccourcissement de la longueur des télomères. Nous

avons observé que la délétion de *SET1* dans chacun de ces mutants aggrave ce phénotype suggérant que Set1 régule les télomères dans une voie différente de celle de Mre11 et Tel1. Il a été décrit récemment que le mutant *sml1Δ mec1Δ tel1Δ* avait non seulement des télomères très courts, mais aussi de nombreux réarrangements chromosomiques et une haute fréquence d'aneuploïdie (McCulley et Petes 2010). Il serait intéressant d'analyser l'instabilité génétique du mutant *sml1Δ mec1Δ tel1Δ set1Δ*.

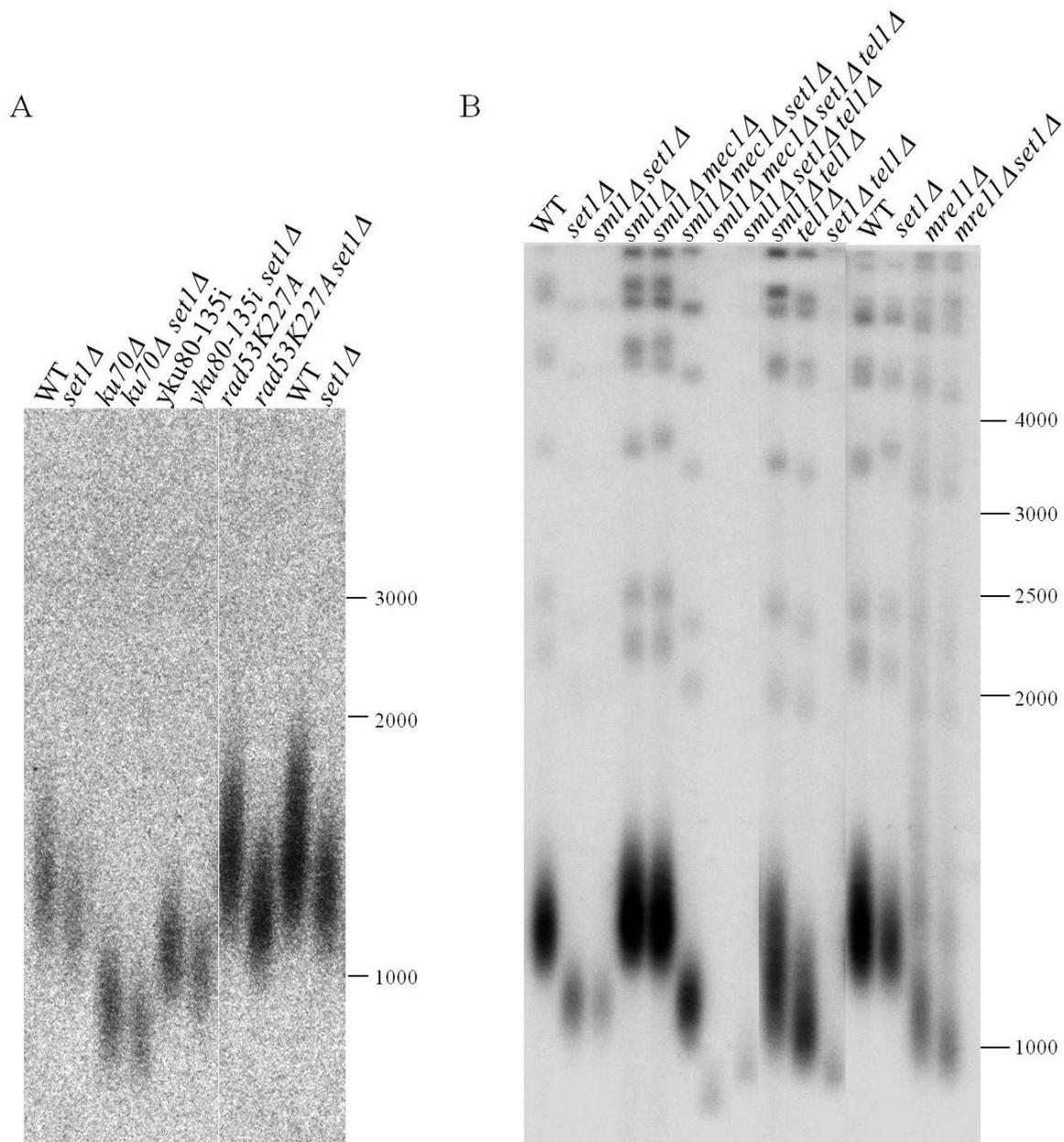


Figure 61 Effet de la délétion de *SET1* sur la longueur des télomères de mutants affectés dans la régulation positive de la taille des télomères. La délétion de *SET1* dans les mutants de l'hétérodimère *yKu70/K80*, des kinases *Tel1*, *Mec1* et *Rad53* (fond génétique 917) ainsi que de l'endo/exonucléase *Mre11* (fond génétique W303) qui ont tous des télomères courts comparé à la souche sauvage, entraîne un raccourcissement supplémentaire de la taille des télomères. Le Southern blot a été réalisé à partir d'un gel d'agarose 1.2%. La sonde utilisée a été purifiée à partir du plasmide *sp100* digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* et marquée au dCTP- $\alpha^{32}P$.

5. La délétion de *SET1* aggrave le rallongement des télomères des mutants impliqués dans la régulation négative des télomères.

A la suite des observations présentées dans la paragraphe précédent, j'ai analysé l'effet de la délétion de *SET1* sur certains facteurs impliqués dans le régulation négative de la longueur des télomères, notamment les protéines Rif1, Rif2 et Pif1.

Rif1 et Rif2 inhibent l'élongation des télomères par la télomérase par deux mécanismes distincts. Rif2 inhibe la dégradation nucléolytique du télomère dépendante de Mre11 et réduit l'accès de Tel1 aux télomères (Bonetti et al. 2010) (Hirano et al. 2009) (McGee et al. 2010). La protéine Rif1 joue quant à elle un rôle de soutien de la fonction du complexe CST, soit dans la synthèse du brin télomérique complémentaire par son couplage avec le complexe polymérase alpha, soit en inhibant l'accès des nucléases aux extrémités télomériques (Anbalagan et al. 2011). La délétion de *RIF1* entraîne un rallongement de la taille des télomères de 200 à 300 pb alors que celle de *RIF2* a un effet moins important avec un rallongement de 100 pb. La double délétion de *RIF1 RIF2* a un effet synergique avec un augmentation de la taille des télomères allant de 600 pb à 2.5kb (Wotton et Shore 1997).

J'ai analysé l'effet de la délétion de *SET1* sur la longueur des télomères des cellules *rif1Δ*, *rif2Δ*, et *rif1Δrif2Δ*. De façon surprenante, la délétion de *SET1* rallonge les télomères dans les mutants *rif1Δ* et *rif2Δ* ainsi que dans le double mutant *rif1Δ rif2Δ*. Il faut noter que l'introduction de la mutation *set1Δ* dans les mutants *rif1Δ*, *rif2Δ* et *rif1Δ rif2Δ* augmente l'hétérogénéité de taille des télomères comparé aux simples mutants (*Figure 62A*).

L'hélicase Pif1 est également un régulateur négatif de la télomérase puisque son activité d'hélicase préférentielle sur les hybrides ARN/ADN, déstabilise l'interaction entre l'ARN de la télomérase et l'ADN télomérique. La délétion de *SET1* dans un mutant *pif1Δ* aggrave le phénotype télomérique observé avec un rallongement de la taille des télomères de 200 à 300 pb (*Figure 62B*).

Set1 fonctionne donc dans une (ou plusieurs voies) différentes de l'ensemble de celles que nous avons testées. De manière paradoxale, l'inactivation de Set1 a un effet différent sur la longueur des télomères dans les régulateurs positifs et négatifs de la télomérase. Chez les mutants qui contrôlent le recrutement ou l'activité de la télomérase à travers la résection et la phosphorylation de cibles importantes pour le recrutement de la télomérase (*tel1Δ* et *mre11Δ*), l'inactivation de Set1 sur-raccourcit les télomères. A l'inverse, dans des conditions où la télomérase est dérégulée (sur-recrutement de Tel1 dans le mutant *rif2Δ*, diminution de la

synthèse du brin complémentaire dans le mutant *rif1Δ*, et augmentation de la processivité dans le mutant *pif1Δ*), l'inactivation de Set1 sur-allonge les télomères. Il est possible que ces résultats dévoilent deux fonctions de Set1 ayant des activités antagonistes sur la régulation de la taille des télomères.

Récemment il a été montré au sein de notre laboratoire que le mutant *set1Δ* présente un défaut de croissance dans des mutants de réplication (*orc5*) (C. de la Roche Saint-André, résultats non publiés). Il a été montré que les télomères courts se répliquaient de façon précoce à cause d'une activation précoce des origines au voisinage des télomères, dans les régions subtélomériques (Bianchi et Shore 2007b). Cette activation précoce des origines télomériques favoriserait l'action de la télomérase. Il serait intéressant d'analyser si la délétion de *SET1* affecte le timing d'activation des origines subtélomériques proches des télomères. L'inactivation de Set1 pourrait inhiber l'activation précoce des origines et conduire à un sur-raccourcissement des télomères.

De la même façon, si Set1 facilitait la synthèse du brin complémentaire par le complexe Pol α primase, on peut imaginer qu'un défaut de synthèse du brin complémentaire dans un contexte où celle-ci est affectée (comme chez le mutant *rif1Δ*) conduirait à un sur-allongement des télomères. De manière intéressante, la délétion de *SET1* sur-allonge plus les télomères *rif1Δ* que les télomères *rif2Δ*.

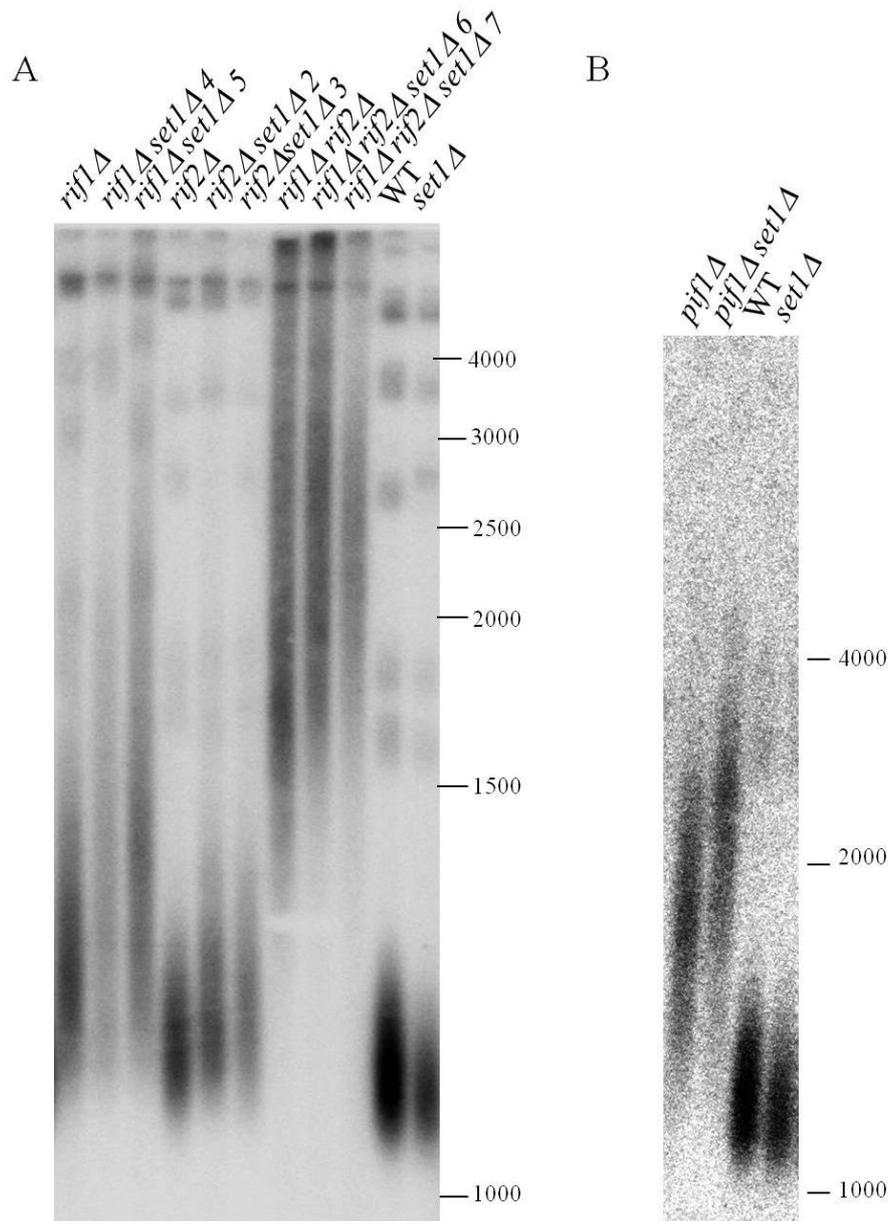


Figure 62 Effet de la délétion de *SET1* sur la longueur des télomères de mutants impliqués dans la régulation négative de la taille des télomères. La délétion de *SET1* dans les mutants *rif1Δ*, *rif12Δ*, *rif1Δrif2Δ* (A) et *pif1Δ* (B) ayant tous des télomères longs comparé à la souche sauvage, entraîne un rallongement supplémentaire de leurs télomères. Pour chaque double-mutant *rif*, 2 clones indépendants ont été analysés.

Il a été montré que la délétion de *RIF1* aggrave la viabilité des mutants du CST présentant un défaut de protection de l'ADNsb télomérique (*cdc13-1*, *cdc13-5* et *stn1ΔC*) mais pas d'un mutant présentant un défaut de recrutement de la télomérase (*cdc13-2*) (Anbalagan et al. 2011). De plus *Rif1* présente une interaction fonctionnelle avec le complexe Pol α primase. Il semblerait donc que *Rif1* aide le complexe CST à la synthèse du brin complémentaire à travers le recrutement de Pol α primase. L'inactivation simultanée de ces

deux acteurs entraîne donc une augmentation de l'ADNsb liée à un défaut de la synthèse du brin C-riche et une activation de la réponse aux dommages à l'ADN (Anbalagan et al. 2011).

Afin de déterminer si Set1 joue un rôle dans la réplication du brin retardé aux télomères nous avons étudié la viabilité du double mutant *cdc13-1 set1Δ* comparé au simple mutant *cdc13-1*. La Figure 66A montre que la délétion de *SET1* aggrave la viabilité des cellules *cdc13-1* alors que les cellules *set1Δ* n'ont aucun défaut de croissance (*données non montrées*). Ce défaut de croissance pourrait être du à une augmentation de la réponse aux dommages à l'ADN. De façon concordante, une étude menée au laboratoire a montré que la délétion de *SET1* entraînait une hyperphosphorylation de Rfa2 dépendante de Rad53 (Schramke et al. 2001). La délétion de *SET1* dans le mutant *cdc13-1* n'a quant à elle que très peu d'effet sur la longueur des télomères (*Figure 63B*). Afin de déterminer si Set1 joue un rôle dans l'initiation de la réplication du brin retardé au télomère, il serait intéressant de mesurer l'ADNsb généré dans le double mutant *cdc13-1 set1Δ* comparé aux simples mutants. Set1 étant nécessaire à la formation du COMPASS et donc au recrutement des autres sous-unités, nous suggérons qu'il ne soit qu'un intermédiaire dans l'initiation de la transcription par Pol α primase.

Une deuxième hypothèse se basant sur la régulation des TERRA (TElomeric Repeats containing RNA) dans la cellule pourrait expliquer le sur-allongement des télomères causé par la délétion de *SET1*. Les TERRA sont de longs ARN non codants, contenant des répétitions télomériques transcrits par l'ARN polymérase II qui ont été mis en évidence chez la souris, la levure *S. cerevisiae*, le poisson zèbre et chez l'Homme (Azzalin et al. 2007) (Schoeftner et Blasco 2008). Chez la levure, l'exonucléase Rat1 5'-3' régule leur niveau dans la cellule via leur dégradation (Luke et al. 2008). On ne connaît pas encore leur implication dans la régulation des télomères, mais, l'inactivation du système de dégradation des TERRA dans plusieurs organismes s'accompagne d'une perte télomérique (Azzalin et al. 2007) (Luke et al. 2008). Plusieurs données indiquent que ces molécules seraient impliquées dans la régulation négative de la télomérase (Schoeftner et Blasco 2008). Les TERRA ont été décrits comme s'associant à la chromatine télomérique ce qui réprimerait l'accessibilité de la télomérase aux télomères (Luke et al. 2008) (Azzalin et al. 2007) (Schoeftner et Blasco 2008). La deuxième hypothèse pouvant expliquer le sur-allongement de la taille des télomères causé par la délétion de *SET1* se base sur deux études de la régulation des TERRA réalisées chez *S. cerevisiae* et dans des cellules de mammifères (Iglesias et al. 2011) (Caslini et al. 2009). La première étude montre un rôle des protéines RIF, SIR et Rap1 dans la régulation du niveau de

TERRA dans les cellules. Il est montré que les protéines Rif1 et Sir2 réprime le niveau des TERRA aux télomères X et XY' respectivement, à travers la répression transcriptionnelle des TERRA et non leur dégradation. Rap1 réprime également le niveau de TERRA dans les cellules à travers leur répression transcriptionnelle et leur dégradation (Iglesias et al. 2011). Une déprotection des télomères semble donc corrélée avec une augmentation de la transcription des TERRA. La deuxième étude menée chez la souris met en évidence que MLL, l'homologue de Set1 chez l'homme est capable de se fixer aux télomères et de triméthyliser H3K4. Lorsque les télomères sont déprotégés (inactivation de TRF2), il est observé une augmentation significative de la transcription des TERRA dépendante de MLL (en réponse à l'activation de p53) (Caslini et al. 2009). Or l'accumulation des TERRA inhibe l'accès de la télomérase aux télomères. Il serait donc facile d'imaginer que dans des conditions de télomères déprotégés, l'inactivation de Set1/MLL qui entraîne une diminution de la transcription des TERRA facilite ainsi l'accès de la télomérase favorisant la surélongation de la taille des télomères.

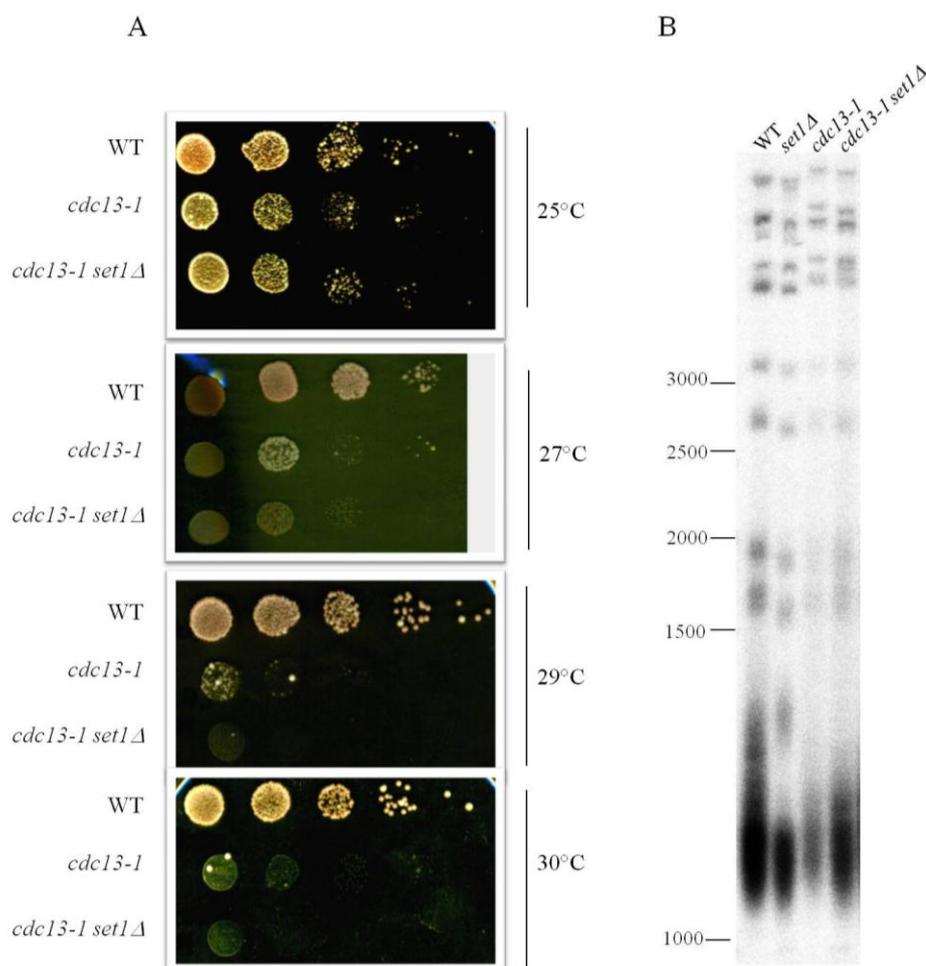


Figure 63 Effet de la délétion de *SET1* sur la viabilité et la longueur des télomères des cellules *cdc13-1*. La délétion de *SET1* aggrave de défaut de croissance des cellules *cdc13-1* à température restrictive et entraîne un léger raccourcissement de la taille des télomères. Un test en goutte a été effectué par des dilutions successives de 10 en 10 à partir de cellules sauvages *cdc13-1* et *cdc13-1 set1Δ*. La délétion du gène *SET1* aggrave le défaut de croissance des cellules *cdc13-1* à température restrictive.

6. Le raccourcissement des télomères du mutant *set1Δ* ne semble pas lié à la voie de régulation des télomères par TERRA.

Afin de déterminer s'il existe un lien entre la transcription des ARN télomériques et la régulation de la taille des télomères par Set1, j'ai regardé l'effet de la délétion de *SET1* sur la longueur des télomères du mutant *rat1-1*. La Figure 64A montre que la délétion de *SET1* entraîne un raccourcissement de la taille des télomères du mutant *rat1-1*. Ceci indique que dans des conditions sauvages, Set1 et Rat1 ne semblent pas impliqués dans une même voie de régulation de la taille des télomères. L'étude de l'expression des transcrits TERRA montre que la mutation *rat1-1* entraîne leur accumulation (Figure 64B). En revanche, l'absence de détection des TERRA dans les cellules sauvages ne permet pas de conclure quant à leur

niveau dans les cellules *set1Δ*. Le défaut de protection des télomères chez l'homme (inactivation de TRF2) ou chez la levure (*rif1Δ*, *rif2Δ*, *rap1ΔC*) entraînant une augmentation de la transcription des TERRA (dépendante de MLL chez l'homme) il serait intéressant mesurer la quantité de TERRA dans un double mutant *rap1ΔC set1*.

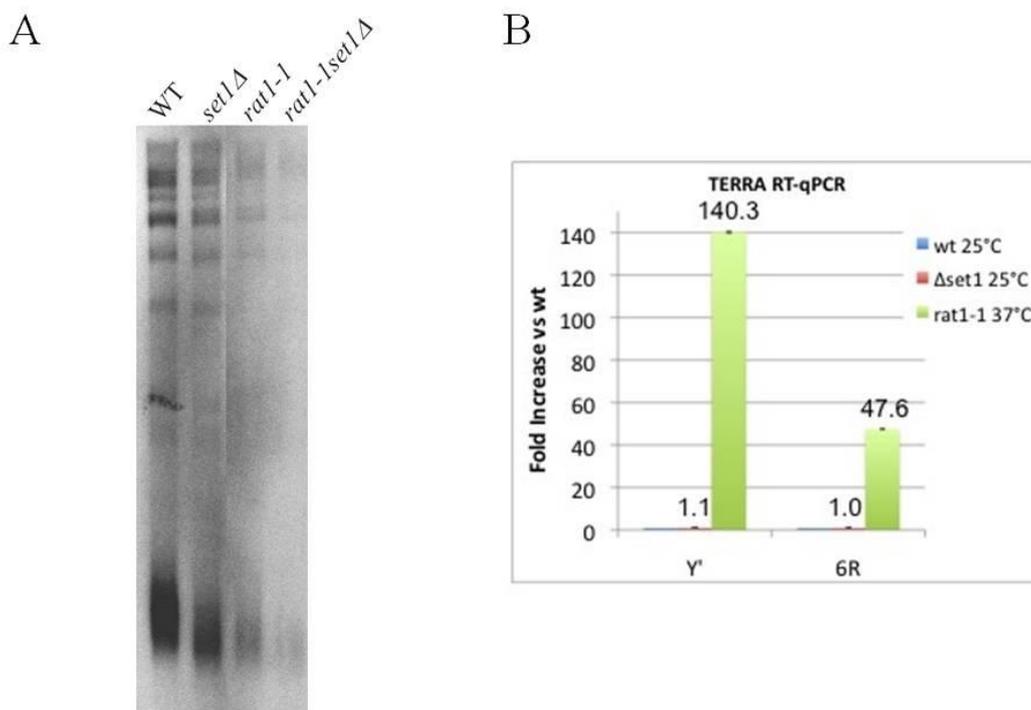


Figure 64 Effet de la délétion de SET1 sur la taille des télomères des cellules *rat1-1* et sur la transcription des TERRA. (A) Le Southern blot montre un effet additif des mutations *set1Δ* et *rat1-1* sur le raccourcissement de la taille des télomères. L'ADN génomique a été digéré par *XhoI* et hybridé avec une sonde TG1-3 spécifique des séquences télomériques. (B) La quantification des transcrits TERRA a été réalisée après une RT-qPCR spécifique, dans des cellules sauvages, *set1Δ* et *rat1-1* dans les régions subtélomériques (Y') et télomériques (6R) (RT-qPCR réalisée par Nahid Iglesias).

III. Effet du ciblage de Set1 au télomère

Afin de déterminer si Set1 joue un rôle localement aux télomères, nous avons réalisé un ciblage de la protéine Set1 aux télomères grâce à l'insertion d'une région comportant 6 séquences UAS (Upstream Activation Sequence), séquences cibles de la protéine Gal4 au niveau du télomère gauche du chromosome VII. Le domaine de fixation de la protéine Gal4 (Gbd pour "Gal4 binding domain") a été fusionné à la protéine Set1 en région N-terminale, permettant le ciblage de Set1 au niveau des séquences UAS télomériques (Figure 65). Le gène *URA3* a été inséré en amont des séquences UAS.

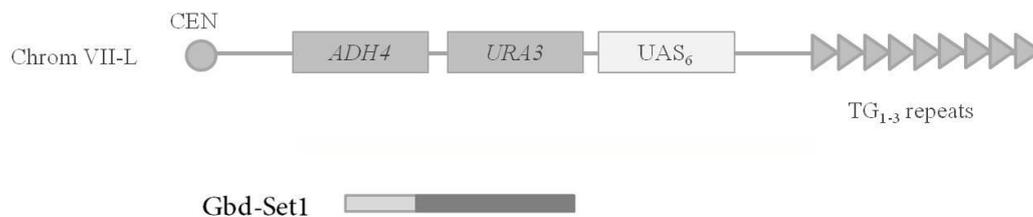


Figure 65 Ciblage de Set1 au télomère VII-L. Six séquences cibles UAS de la protéine Gal4 ont été insérées au niveau du télomères VII-L de *S. cerevisiae*. La protéine Set1 fusionnée au domaine de fixation Gbd de la protéine Gal4 permet le ciblage de Set1 au télomère. Le gène *URA3* est également inséré dans la région télomérique

Dans un premier temps, nous avons regardé si la présence ciblée de Set1 au niveau du télomère VII-L modifiait localement l'état de la chromatine. Pour cela, nous avons réalisé un test en goutte afin de mesurer l'expression du gène *URA3* présent au télomère VII-L. Dans des cellules sauvages, l'état condensé de la chromatine au télomère réprime l'expression du gène *URA3*. Les cellules dont le gène *URA3* n'est plus réprimé, sont capables de métaboliser l'acide 5-fluoroorotic (5'-FoA) en un dérivé toxique. Seules les cellules réprimant l'expression du gène *URA3* sont donc capables de former des colonies sur un milieu contenant du 5'-FoA. Nous avons vu précédemment que grâce à cette méthode, il a été mis en évidence une dé-répression du gène *URA3* dans un mutant *set1Δ*.

Nous avons donc mesuré de la même manière l'expression du gène *URA3* présent sur le télomère VII-L, cible de la protéine Gbd-Set1.

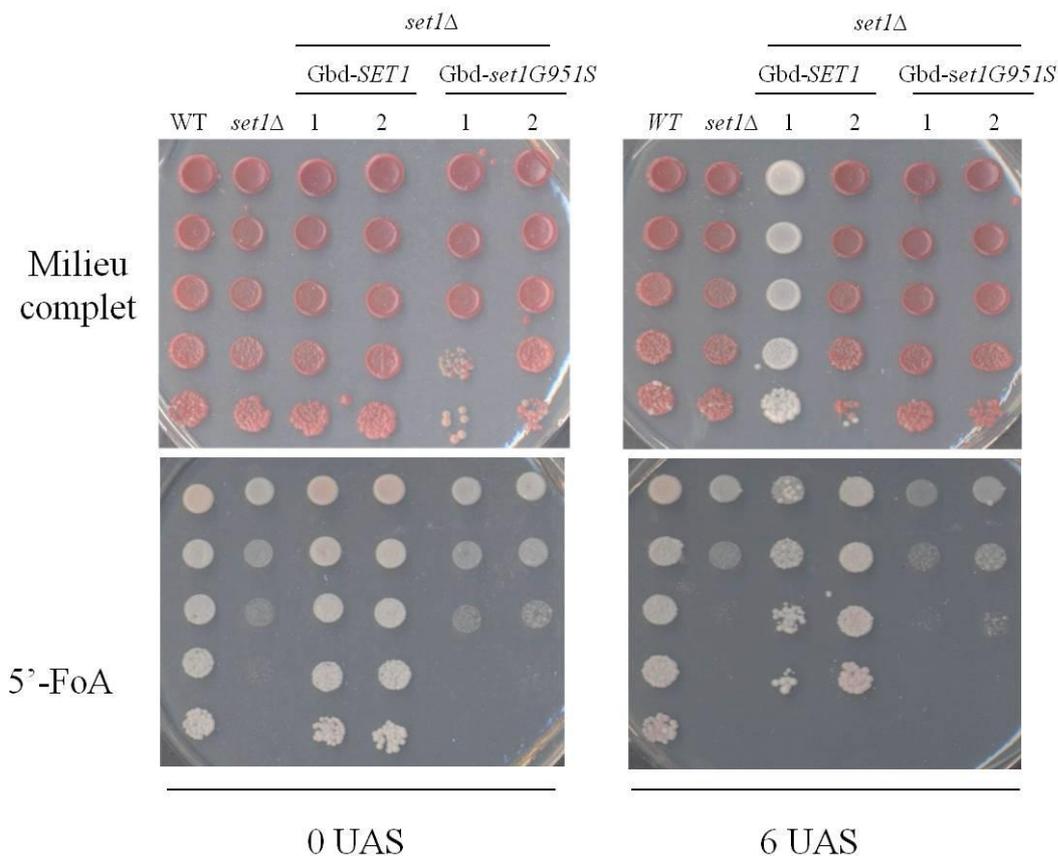


Figure 66 Le ciblage de la protéine Gbd-Set1 au télomère VII-L déreprime partiellement l'expression du gène *URA3*. L'expression du gène *URA3* a été mesurée par un test en goutte avec des dilutions allant de 10 en 10 sur un milieu complet et un milieu contenant du 5'-FoA à 1mg/ml. Les cellules ont été incubées à 30°C pendant 2 jours (L.Acquaviva)

Les résultats du test en goutte montrent comme nous l'attendions, une dérepression de l'expression du gène *URA3* dans le mutant *set1Δ*. L'introduction de la protéine fusion Gbd-Set1 dans les cellules ne comportant aucune séquence UAS cible restaure efficacement le phénotype sauvage (Figure 66, pannel gauche). En revanche, le ciblage de la protéine Gbd-Set1 au niveau du télomère VII-L (6 UAS) déreprime partiellement l'expression du gène *URA3* (Figure 66, pannel droit) comparé aux cellules sauvages. Ces résultats montrent que le ciblage de la protéine Gbd-Set1 au niveau du télomère VII-L modifie localement l'état de la chromatine. Alors que la dérepression du gène *URA3* dans un mutant *set1Δ* pourrait être la conséquence d'une modification globale de l'état de la chromatine entraînant une relocalisation des protéines Sir à l'origine du TPE, la méthylation inhabituelle de H3K4 dans cette région pourrait quant à elle entraîner une décondensation locale de la chromatine à l'origine de la dérepression partielle de l'expression du gène *URA3*.

Nous avons ensuite étudié l'effet du ciblage de la protéine Gbd-Set1 sur la longueur des télomères. La présence de la protéine fusion Gdb-Set1 complémente la délétion de *SET1*. En effet, la méthylation de H3K4 est rétablie à un niveau sauvage (*donnée non montrée*) et la longueur de l'ensemble des télomères retrouve une longueur similaire à celle observée dans les cellules sauvages (*Figure 67B*).

Alors que la délétion de *SET1* entraîne un raccourcissement de la longueur du télomère VII-L, le ciblage de la protéine Gbd-Set1 sur ce même télomère entraîne un raccourcissement du télomère supérieur à celui observé dans le mutant *set1Δ* (*Figure 67A*).

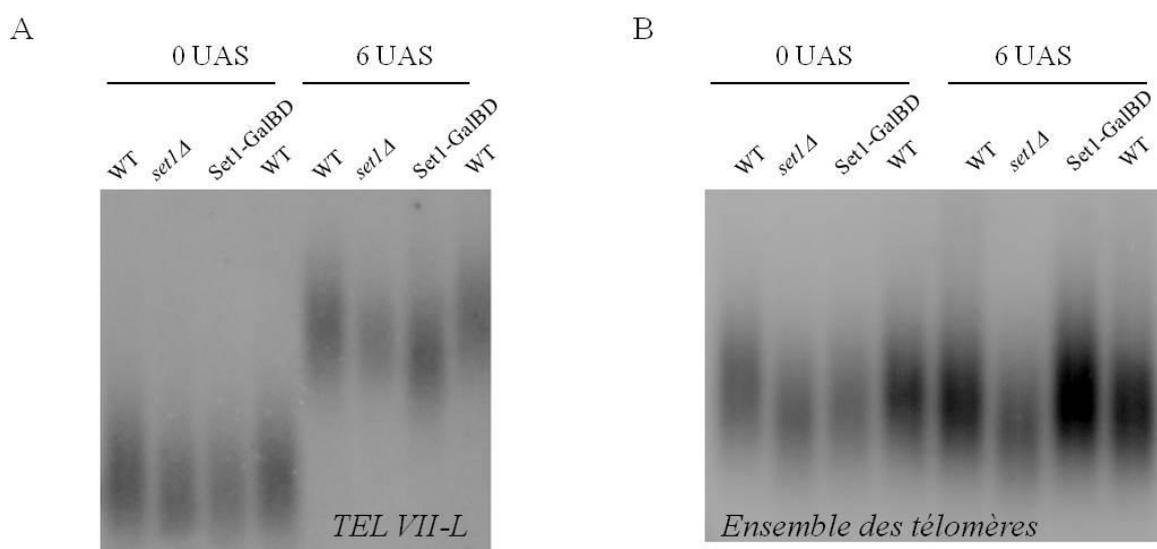


Figure 67 Ciblage de Set1 au télomère VII-L. Effet du ciblage de la protéine fusion Gbd-Set1 (A) sur la longueur du télomère cible VII-L; (B) sur l'ensemble des télomères. Dans chacun des cas, l'effet de la protéine Gbd-Set1 sur la longueur des télomères a été mesurée en absence (0 UAS) ou en présence (6 UAS) des séquences cibles de la protéine. La longueur de l'ensemble des télomères a été mesurée après digestion des ADN génomiques par l'enzyme de restriction *XhoI* puis hybridation avec une sonde TG1-3. La longueur du télomère VII-L a été mesurée après digestion des ADN génomiques par les enzymes de restriction *XhoI* et *HindIII* puis hybridation avec une sonde URA3 (L.Acquaviva).

Il semblerait que le ciblage de Set1 dans la région télomérique modifie l'état de la chromatine qui pourrait être à l'origine d'un raccourcissement de la taille des télomères. Une étude a mis en évidence que MLL, l'homologue de Set1 chez l'homme est capable de se fixer aux télomères et de triméthyliser H3K4. Lorsque les télomères sont déprotégés (inactivation de TRF2), il est observé une augmentation significative de la transcription des TERRA dépendante de MLL (en réponse à l'activation de p53). Or l'accumulation des TERRA inhibe l'accès de la télomérase aux télomères. Le ciblage de Set1/MLL aux télomères pourrait contourner la signalisation p53 à l'origine de l'augmentation de la transcription des TERRA

par MLL ce qui inhiberait la télomérase et provoquerait un raccourcissement de la taille des télomères.

Afin de déterminer si l'effet télomérique observé est bien lié à l'activité catalytique de Set1, le mutant catalytique GalBD-Set1-G951S a été ciblé au télomère VII-L. La Figure 68 montre que la perte de l'activité catalytique de Set1 abolit le raccourcissement du télomère VII-L observé lors du ciblage de la protéine sauvage. Le télomère VII-L présente en effet une taille similaire à celle observée dans le mutant *set1Δ* ce qui est en accord avec l'hypothèse proposée précédemment.

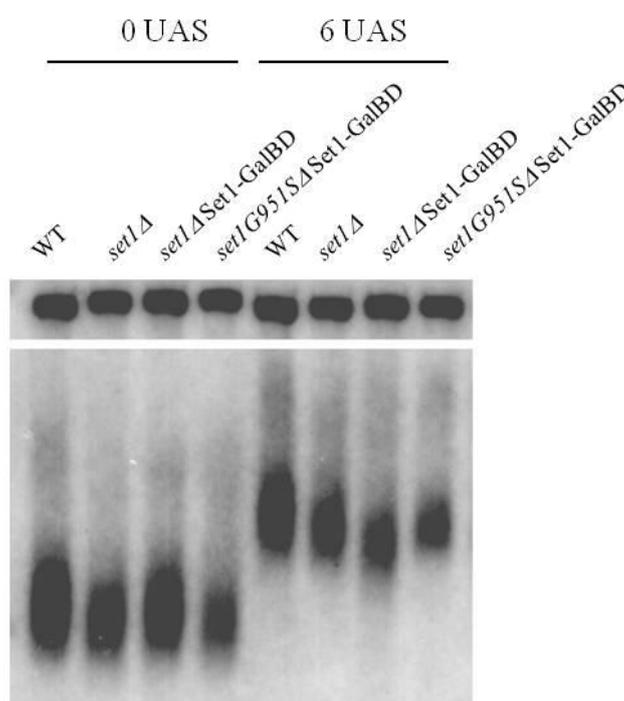


Figure 68 Rôle de l'activité catalytique de Set1 sur le raccourcissement du télomère VII-L. La mutation catalytique *set1-G951S* entraîne une perte de l'effet observé sur la longueur du télomère VII-L dans les cellules GalBD-Set1 (*L.Aquaviva*).

III.Rôle de Set1 sur l'adaptation des cellules et la résection des extrémités d'ADN après induction d'une CDB non réparable.

1. Set1 et l'adaptation

- Introduction

Le processus d'adaptation définit la capacité des cellules à sortir d'un arrêt du cycle cellulaire G2/M malgré la présence de dommage à l'ADN (Sandell et Zakian 1993) et dépend

de nombreuses protéines dont Cdc5, Rad9 et Rad17. Cdc5, membre de la famille des polo-kinases est nécessaire pour le passage des cellules en anaphase et pour la sortie de mitose. Elle est phosphorylée de façon dépendante à Rad53 en cas de lésions de l'ADN. Les protéines Rad9 et Rad17 sont impliquées dans la transduction du signal de dommages à l'ADN.

Le système Gal-HO utilisé précédemment est un bon outil d'étude du processus d'adaptation. La cassure double-brins créée au locus *MAT* par l'endonucléase HO est réparée par recombinaison homologe (RH) à partir des donneurs *HML* et *HMR*. En absence de donneurs, seulement 1 cellule sur 1000 survie grâce à la réparation NHEJ (Moore et Haber 1996).

La réparation NHEJ dépend entre autre des gènes codant pour le complexe MRX ou l'hétérodimère γ KU qui jouent un rôle mineur dans la réparation par RH (Boulton et Jackson 1996) (Milne et al. 1996) (Moore et Haber 1996). Un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M est observé environ 4 à 6h après l'induction de l'endonucléase HO (Lee et al. 1998). Cet arrêt n'est pas permanent et 8h après l'induction de l'endonucléase HO, les cellules commencent à se diviser pendant quelques cycles avant que la croissance de la micro-colonie ne cesse définitivement. Sur 110 cellules analysées, 70 se développent en micro-colonies de 3 à 12 cellules au bout de 48h, et 1 colonie ayant probablement réparé la cassure a rétabli sa croissance (Lee et al. 1998). La délétion de *KU70* entraîne un arrêt permanent des cellules 24h ou 48h après l'induction de l'endonucléase HO. De plus, la dégradation 5'-3' des extrémités d'ADN au niveau de la cassure dans un mutant *ku70Δ* est deux fois plus rapide que dans les cellules sauvages. L'arrêt du cycle cellulaire des cellules *ku70Δ* est rétabli par la réduction de la dégradation 5'-3' (Lee et al. 1998). Ku70 joue donc un rôle dans le processus d'adaptation, non pas dans la signalisation des dommages de l'ADN, mais par son effet sur la dégradation 5'-3'. La signalisation des dommages passe par la fixation de RPA sur l'ADN simple-brin. En effet, le mutant *rfa1-t11*, présente un défaut de recrutement de Mec1-Ddc2 mais la fréquence de dégradation 5'-3' n'est pas altérée. Le défaut de signalisation des dommages de l'ADN dans le mutant *rfa1-t11* restaure le défaut d'adaptation du mutant *ku70Δ* (Lee et al. 1998).

- Rôle de Set1 dans le processus d'adaptation.

Nous avons étudié le rôle de Set1 dans le processus d'adaptation. Pour cela, les cellules ont été étalées sur un milieu contenant du galactose, de façon à être isolées. 1h, 7h, 24h et 80h après, un comptage a été réalisé de façon à déterminer le nombre de cellules bloquées en phase G2/M ou celles capables de former des micro-colonies. Après 7h d'induction, environ

90% des cellules sont bloquées en phase G2/M dans les différentes souches étudiées. Comme décrit précédemment, la Figure 69 montre un défaut d'adaptation du mutant *ku70Δ* comparé aux cellules sauvages. En effet, au bout de 24h, alors que la majorité des cellules sauvages ont redémarré leur division, presque 50% des cellules *ku70Δ* restent bloquées en phase G2/M. La délétion de *SET1* entraîne également un défaut d'adaptation avec presque 30% des cellules toujours bloquées après 24h. La double délétion *KU70 SET1* a un effet synergique sur le défaut d'adaptation des cellules avec plus de 80% des cellules toujours bloquées au bout de 24h. Ces résultats suggèrent que l'hétérodimère yKu et Set1 jouent un rôle dans le processus d'adaptation des cellules après un dommage à l'ADN non réparable à travers deux mécanismes distincts.

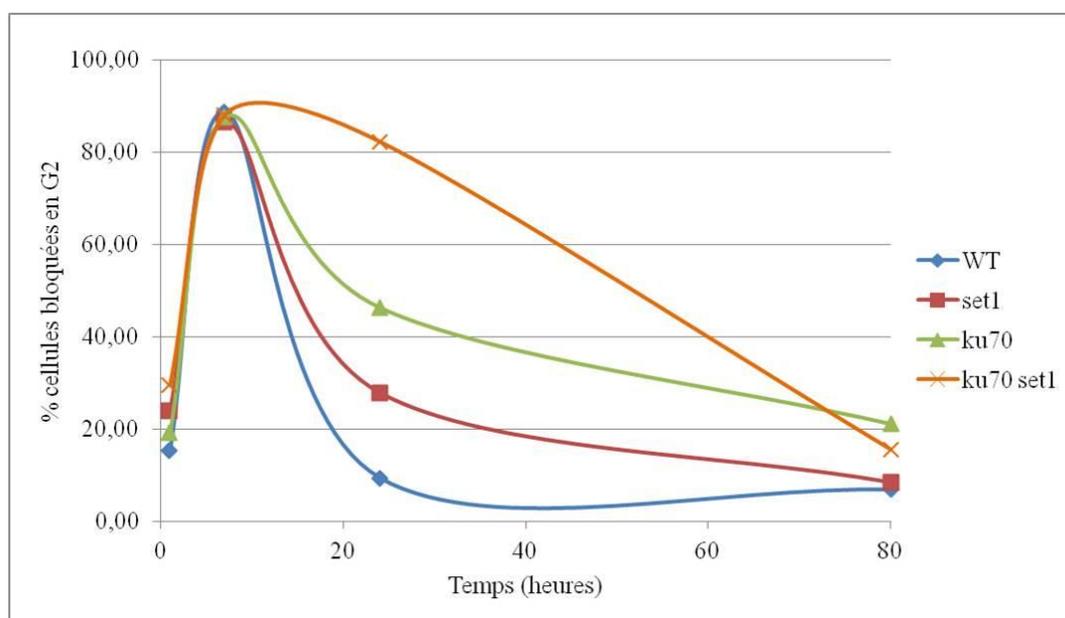


Figure 69 La délétion de *SET1* entraîne un défaut d'adaptation des cellules présentant une CDB non réparable par RH. Alors que 24h après l'induction de la cassure *HO*, la majorité des cellules sauvages sortent de l'arrêt du cycle G2/M, environ 30% et 50% des cellules *set1Δ* et *ku70Δ* respectivement restent bloquées. La double délétion *KU70 SET1* a un effet synergique sur le défaut d'adaptation (C. de la Roche Saint André)

Le défaut d'adaptation du mutant *ku70Δ* étant restauré soit par la diminution de l'ADN simple-brin à la cassure, soit par le défaut de signalisation du mutant *rfal-t11*, nous avons étudié la fréquence de dégradation 5'-3' dans un mutant *set1Δ*.

2. Set1 et la résection 5'-3' aux cassures de l'ADN.

En réponse à des cassures double-brins (CDB) de l'ADN, les facteurs impliqués dans la signalisation des dommages à l'ADN et la réparation sont recrutés au site de lésion. La formation de l'ADN simple-brin fixé par la protéine RPA génère une structure importante pour le recrutement des différents facteurs. La résection au niveau d'une CDB fait intervenir un mécanisme en deux étapes. Sae2 et Mre11 participent au processus de résection précoce en enlevant un petit oligonucléotide de l'extrémité d'ADN à l'origine de la formation des premiers intermédiaires d'ADNsb. Dans un second temps, Exo1 et/ou Sgs1 génère un long intermédiaire d'ADN simple-brin servant de substrat pour Rad51 (Mimitou et Symington 2008). Le recrutement du complexe Mec1/Ddc2 au site lésion, stimulé par la présence de RPA sur l'ADN simple-brin initie le signal conduisant à la phosphorylation de différentes cibles telles que Ddc2, Ddc1, Rad9 ainsi que les kinases Chk1 et Rad53.

L'adaptation à la signalisation des dommages à l'ADN dépend de la présence de l'ADNsb généré durant le processus de résection. En effet, l'augmentation de l'ADNsb, entraîne une augmentation de la voie de signalisation des dommages à l'ADN à l'origine d'un défaut d'adaptation des cellules (comme c'est le cas dans le mutant *ku70Δ*) (Lee et al. 1998).

Les cellules *set1Δ* présentent un défaut d'adaptation, ce qui suggère une augmentation de la signalisation des dommages à l'ADN, induite par une augmentation des intermédiaires d'ADNsb. En effet, la délétion de *SET1* aggrave la viabilité des cellules *cdc13-1* (Figure 63).

Afin de déterminer si Set1 est impliqué dans le processus de résection au niveau d'une CDB, nous avons mesuré l'apparition des intermédiaires d'ADN simple-brin après induction d'une cassure double-brins de l'ADN. Pour cela, nous avons utilisé la souche JKM179 décrite précédemment dans un contexte sauvage et *set1Δ*. Les cellules ont été arrêtées en phase G2 par ajout de 20 µg/ml de Nocodazole afin d'éviter les effets sur la résection dépendants du cycle cellulaire, puis des aliquotes ont été récoltées tous les quarts d'heure après l'induction de l'endonucléase HO. Les régions d'ADN simple-brin sont révélées par la perte des sites de restriction en région distale du site HO menant à une accumulation de fragments d'ADN non coupés, détectés avec une sonde spécifique du locus *MAT* (Figure 70A).

La Figure 70 montre que la délétion de *SET1* semble entraîner un léger délai dans l'apparition des intermédiaires d'ADN simple-brin. En effet, le fragment à 3500 pb apparaît à 45 min et 60 min après l'induction de l'endonucléase HO dans les souches sauvage et *set1Δ* respectivement. Le défaut d'adaptation des cellules *set1Δ* n'est donc pas lié à une

augmentation de la signalisation des dommages à l'ADN induite par une augmentation des intermédiaires d'ADNsb. De façon concordante, l'aggravation du défaut d'adaptation des cellules *ku70Δ set1Δ* montre que Set1 et Ku70 sont impliqués dans l'adaptation des cellules après cassure de l'ADN non réparable à travers deux mécanismes distincts. Alors que Ku70 limite la résection et donc la signalisation des dommages à l'ADN, le mécanisme d'action de Set1 reste à élucider.

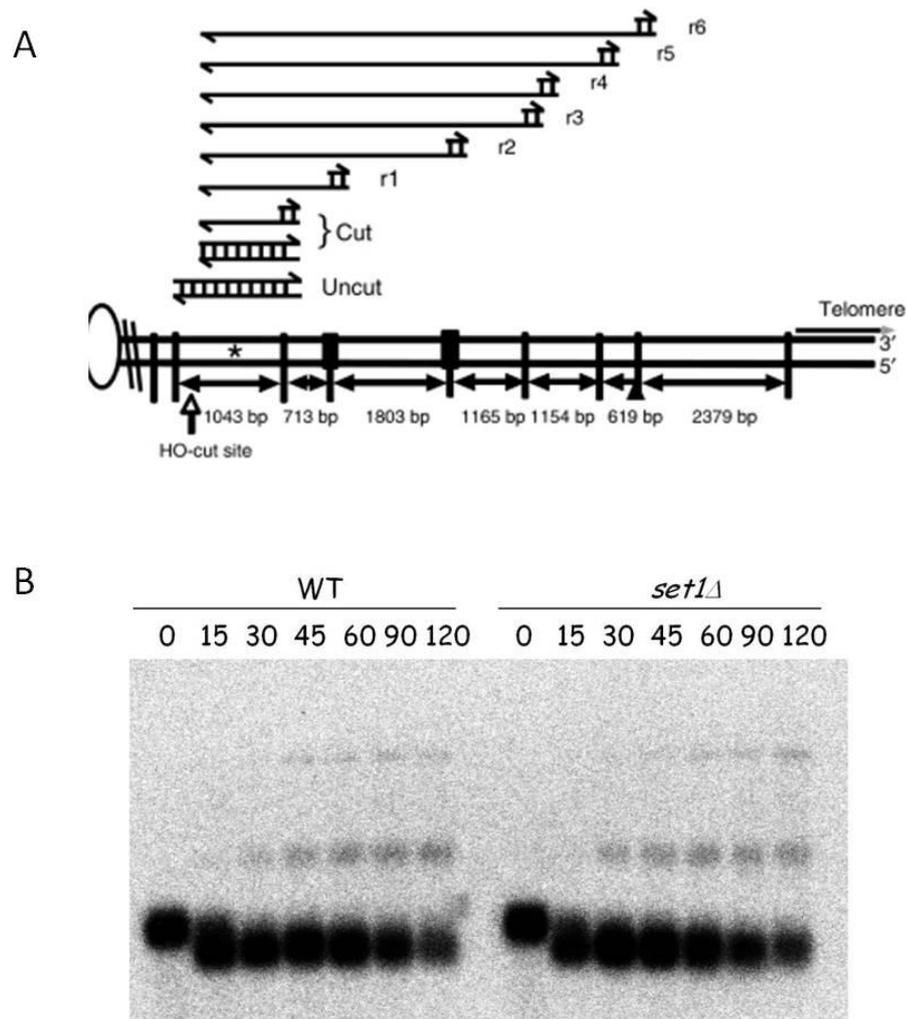


Figure 70 La résection au niveau d'une cassure induite de l'ADN est plus lente dans un mutant *set1Δ*. Les cellules JKM179 sauvages et *set1Δ* qui présentent un site de coupure HO unique au niveau du locus MAT et expriment l'endonuclease HO sous le contrôle du promoteur GAL1 sont cultivées en présence de lactate et bloquées en phase G2 par ajout de nocodazole. L'endonuclease HO est induite par ajout de galactose. L'ADN génomique est extrait des cellules récoltées à différents temps. (A) Représentation schématique du locus MAT. Le site HO est indiqué et la région d'hybridation de la sonde marquée par un asterisk. Les barres verticales indiquent les sites de digestion de l'enzyme de restriction SspI. (B) Les fragments d'ADN digérés sont séparés sur un gel alcalin en condition dénaturante. La résection est mesurée par Southern blot avec une sonde spécifique du locus MAT.

Chapitre 3:

Conclusion, Discussion

L'histone méthyltransférase Set1 est la sous-unité catalytique d'un complexe protéique composé de huit protéines, appelé COMPASS qui catalyse la mono-, di- et triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3. La délétion de *SET1* conduit à des effets pléiotropiques tels que des défauts de la structure et de la fonction des télomères, de la méiose, de la transcription de certains gènes et de la réparation de l'ADN mais les mécanismes moléculaires impliqués sont encore mal connus. Des études récentes ont permis une avancé sur la compréhension du rôle de Set1 notamment dans la méiose et la réparation (Borde et al. 2009) (Faucher et Wellinger 2010). Une partie de mon travail de thèse a eu pour but de comprendre les mécanismes moléculaires conduisant au raccourcissement des télomères observé dans un mutant *set1Δ* (Corda et al. 1999).

1. Implication partielle de la méthylation de H3K4 dans la régulation de la taille des télomères des cellules *set1Δ*.

La première démarche à la compréhension du rôle de Set1 dans la régulation de la taille des télomères a été de déterminer si le défaut de méthylation de H3K4 dans le mutant *set1Δ* causait ce phénotype. L'étude de la taille des télomères de différents mutants du COMPASS a permis d'étudier séparément les rôles de la mono-, di- et triméthylation de H3K4. En effet, la délétion de *SET1*, *SWD1* et *SWD3* abolit les trois états de méthylation de H3K4, alors que celle de *BRE2* ou *SDC1* entraîne une perte complète de H3K4me3 ainsi qu'une diminution significative de H3K4me2. La délétion de *SPP1* présente seulement une forte diminution de H3K4me3. Les résultats ont montré que le raccourcissement des télomères des cellules *set1Δ* est principalement lié à la perte de di- et tri-méthylation de H3K4.

La découverte d'une nouvelle cible de Set1, la protéine du kinétochore Dam1 (Zhang et al. 2005) a posé l'éventualité d'un rôle de Set1 dans la méthylation de cibles autre que H3K4, impliquée dans le raccourcissement des télomères des cellules *set1Δ*. En effet, la délétion de *SET1* dans un mutant *H3K4R* non méthylable aggrave le raccourcissement des télomères.

2. La perte de TPE n'est pas à l'origine du raccourcissement des télomères des cellules *set1Δ*.

Il a été suggéré qu'en absence de méthylation de H3K4, les protéines SIR, qui ont une préférence pour les histones non méthylées, se fixeraient sur l'ensemble du génome et seraient ainsi titrées des régions télomériques (Jin et al. 2007). Afin de déterminer si ce phénomène est à l'origine du raccourcissement des télomères des cellules *set1Δ* nous avons recherché une relation d'épistasie entre les mutants *sir3Δ* et *set1Δ* qui présentent tout deux une perte de TPE ainsi qu'un raccourcissement de la taille des télomères d'environ 50pb. L'effet additif des deux mutations sur la taille des télomères montre que l'effet télomérique du mutant *set1Δ* n'est pas une conséquence de la perte de TPE.

3. La voie de régulation de la taille des télomères par TERRA semble indépendante de celle de Set1

La découverte d'ARN non codant, les TERRA, transcrits au niveau des régions télomériques a bousculé l'idée d'un télomère longtemps considéré comme transcriptionnellement inactif (Azzalin et al. 2007) (Schoeftner et Blasco 2008). L'exonucléase Rat1 régule le niveau des TERRA dans la cellule, et empêche ainsi leur accumulation à l'origine de l'inaccessibilité des télomères pour la télomérase (Luke et al. 2008)(Azzalin et al. 2007) (Schoeftner et Blasco 2008).

Bien qu'aucun ARN n'ait encore été identifié *in vivo*, Set1 possèdent deux motifs conservés de reconnaissance de l'ARN dont l'un est capable d'interagir *in vitro* avec des ARNs. Les mutants *rat1-1* et *set1Δ* présentent un raccourcissement de la taille de leurs télomères similaire suggérant un possible lien entre la transcription des ARN télomériques et la régulation de la taille des télomères par Set1. L'aggravation de la taille des télomères dans le double mutant *rat1-1 set1Δ* montre que les deux protéines régulent la taille des télomères par des mécanismes indépendants.

4. Set1: deux activités antagonistes sur la régulation de la taille des télomères?

Dans la suite de l'étude, nous avons étudié l'effet de la délétion de *SET1* sur des mutants régulant positivement ou négativement la taille des télomères. Les résultats ont mis

en évidence deux effets antagonistes de la délétion de *SET1*. Chez les mutants qui contrôlent le recrutement ou l'activité de la télomérase à travers la résection et la phosphorylation de cibles importantes pour le recrutement de la télomérase (*tel1Δ* et *mre11Δ*), l'inactivation de Set1 sur-raccourcit les télomères. A l'inverse, dans des conditions où la télomérase est dérégulée (sur-recrutement de Tel1 dans le mutant *rif2Δ*, diminution de la synthèse du brin complémentaire dans le mutant *rif1Δ*, et augmentation de la processivité dans le mutant *pif1Δ*), l'inactivation de Set1 sur-allonge les télomères.

Une étude menée au laboratoire a montré que le mutant *set1Δ* présente un défaut de croissance dans des mutants de réplication (C. de la Roche Saint-André, résultats non publiés). La réplication précoce des télomères courts liée à une activation précoce des origines au voisinage des télomères, dans les régions subtélomériques (Bianchi et Shore 2007) favoriserait l'action de la télomérase. La délétion de *SET1* pourrait affecter le timing d'activation des origines subtélomériques proches des télomères conduisant à un sur-raccourcissement de la taille des télomères.

Set1 pourrait également faciliter la synthèse du brin retardé initiée par le complexe Polα. Lorsque celle-ci est déjà affectée comme c'est le cas dans le mutant *rif1Δ*, la délétion de *SET1* aggraverait le défaut de synthèse du brin complémentaire et favoriserait l'accès de la télomérase aux télomères entraînant un sur-allongement de la taille des télomères. Cette hypothèse semble être en accord avec le fait que la délétion de *SET1*, comme celle de *RIF1* affecte la viabilité des cellules *cdc13-1* causée par une augmentation de l'ADNsb liée à un défaut de la synthèse du brin C-riche et une activation de la réponse aux dommages à l'ADN. De façon intéressante, une étude menée au laboratoire a montré que la délétion de *SET1* entraînait une hyperphosphorylation de Rfa2 dépendante de Rad53 (Schramke et al. 2001).

Une deuxième hypothèse pouvant expliquer le sur-allongement de la taille des télomères causé par la délétion de *SET1* se base sur une étude de la régulation des TERRA réalisée dans des cellules de mammifères et chez *S. cerevisiae* (Caslini et al. 2009) (Iglesias et al. 2011). Chez les cellules de mammifères, il est mis en évidence que MLL, l'homologue de Set1 chez l'homme est capable de se fixer aux télomères et de triméthyliser H3K4. Lorsque les télomères sont déprotégés (inactivation de TRF2), il est observé une augmentation significative de la transcription des TERRA dépendante de MLL (en réponse à l'activation de p53). Une augmentation de la transcription des TERRA est également observée chez *S. cerevisiae* dans les mutants *rif*, *sir* et *rap1ΔC*. L'accumulation des TERRA dans les cellules de mammifère inhibe l'accès de la télomérase aux télomères. Il serait donc facile d'imaginer que

dans des conditions de télomères déprotégés, l'inactivation de MLL qui entraîne une diminution de la transcription des TERRA facilite ainsi l'accès de la télomérase favorisant la surélongation des télomères.

5. Effet du ciblage de Set1 aux télomères.

Afin d'essayer de mieux comprendre le rôle de Set1 dans la régulation de la taille des télomères, nous avons étudié l'effet du ciblage de Set1 sur le télomère VII-L. Les résultats obtenus montrent que le ciblage de Set1 aggrave le raccourcissement du télomère VII-L observé lors de la délétion de *SET1*. Le ciblage de la protéine Set1-G951S sur le même télomère abolit le raccourcissement du télomère VII-L observé lors du ciblage de Set1, montrant que cet effet est bien lié à l'activité catalytique de Set1. Si l'on se base sur le modèle de régulation de la taille des télomères par TERRA proposé précédemment, le ciblage de Set1/MLL aux télomères pourrait contourner la signalisation p53 à l'origine de l'augmentation de la transcription des TERRA par MLL ce qui inhiberait la télomérase et provoquerait un raccourcissement de la taille des télomères.

Comme précédemment proposé, le raccourcissement de la taille des télomères des cellules *set1Δ* pourrait être lié à un défaut d'activation des origines subtélomériques proches des télomères conduisant à un sur-raccourcissement de la taille des télomères. L'effet du ciblage de Set1 aux télomères activerait quant à lui la transcription de TERRA à l'origine du raccourcissement de la taille du télomère ciblé. L'expression des TERRA n'étant pas détectée par RT-qPCR dans des cellules sauvages, et les mutants *rif/sir/RapΔ1* entraînant une augmentation de l'expression des TERRA, il serait intéressant d'étudier l'effet de la délétion de *SET1* sur la régulation des TERRA dans ces différents mutants.

6. Rôle de Set1 sur l'adaptation des cellules et la résection des extrémités d'ADN après induction d'une CDB non réparable.

En parallèle de l'étude du rôle de Set1 sur la régulation de la taille des télomères nous avons étudié son rôle dans les processus d'adaptation et de résection après l'induction d'une cassure d'ADN non réparable.

Il a été montré que les cellules *yku70Δ* ou *yku80Δ* présentaient un gros défaut d'adaptation après l'induction d'une CDB non réparable. Alors que 24h après l'induction de la

cassure, la majorité des cellules sauvages ont repris leur division, 50% des cellules *yku70Δ* reste bloquées en phase G2. Ceci est la conséquence d'une augmentation de la réponse aux dommages à l'ADN elle-même liée à l'augmentation de l'ADNsb généré à la cassure d'ADN. La délétion de *SET1* entraîne elle aussi un défaut d'adaptation avec environ 30% des cellules toujours bloquées en phase G2. La combinaison des deux mutations aggrave le défaut d'adaptation de chacun des simples mutants montrant que Set1 joue un rôle dans le processus d'adaptation des cellules après dommages non réparables de l'ADN mais dans une voie différente de celle de l'hétérodimère yKu.

Afin de déterminer si le défaut d'adaptation des cellules *set1Δ* est, comme dans le cas de l'hétérodimère yKu, lié à une augmentation de la résection de l'ADN sb à la cassure nous avons mesuré la résection dans un mutant *set1Δ* et montré que non seulement la délétion de *SET1* n'entraîne pas d'augmentation de l'ADNsb, mais qu'en plus, elle semble diminuer sa vitesse de formation. Ceci est en accord avec le fait que Set1 soit impliqué dans un mécanisme différent de celui de Ku70 c'est-à-dire différent du processus de résection.

Matériels
&
Méthodes

1. Souches de levures et milieux de culture

Certains des mutants utilisés pour l'étude de la longueur des télomères du mutant *set1Δ* proviennent de la collection Euroscarf (EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional analysis) et d'autres ont été créés pour cette étude. L'étude des cassures double-brins induite a été réalisée dans la souche JKM179. Toutes les autres études ont été menées dans le background W303.

L'étude des cassures double brin a été réalisée en milieu YPLGg qui sera décrit dans la partie 9. La majorité des autres expériences a été réalisée en milieu YPD (1% Yeast Extract; 1% Bactopeptone; 2% Glucose).

2. Méthode de modification du génotype

2.1. Transformation et Recombinaison homologue pour la délétion ou le tagging des gènes

La délétion de nombreux gènes a été réalisée par recombinaison homologue d'une cassette construite par PCR. Celle-ci est constituée de la séquence du gène de sélection flanquée d'environ 40 nt homologues aux régions 5' et 3' des gènes à déléter. Les gènes de sélection utilisés sont, soit des gènes de résistance à un antibiotique, soit des gènes de synthèse. Les plasmides et amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 7 et le Tableau 8 respectivement. Les mutations ponctuelles *rad53K227A* et *set1G951S* ont été introduites par "pop-in/pop-out" grâce à des plasmides intégratifs linéarisés portant respectivement les mutations *rad53K227A* et *set1G951S*.

Une fois synthétisées par PCR, les cassettes sont introduites dans le génome de la levure par transformation. Pour cela, environ 30ml de cellules en phase exponentielle de croissance ($DO_{600} = 0,8$) sont récoltées puis resuspendues dans 500µl de Chlorure de Lithium 0,1M. 10 µl d'ADN « carrier » (10 mg/ml) (saturation non spécifique), ainsi que 10 µl d'ADN cible et 280 µl de Polyéthylène glycol (PEG-4000 50% ; Tris-HCl 10mM pH 7.5) sont ajoutés à 100 µl de cellules rendues compétentes. Après 1h à 30°C sous agitation, 43 µl de DiMéthylSulfOxide (DMSO) sont ajoutés aux cellules. Les échantillons sont alors soumis à un choc thermique pendant 15 min à 42°C. Les cellules sont remises en culture dans 2ml de YPD pendant au moins 4h, de façon à ce que les cellules synthétisent le marqueur de

résistance avant d'être finalement étalées sur une boîte YPD contenant l'antibiotique et placées dans une étuve à 30°C pendant 3 jours. Pour les cassettes de synthèse, les cellules sont immédiatement étalées sur milieu minimum comportant tous les acides aminés sauf celui utilisé pour la sélection.

Les transformants sont vérifiés en utilisant un couple d'amorces dont l'une se trouve dans le génome de la levure et l'autre dans le gène de sélection. La délétion du gène *SET1* est en plus vérifiée en Westernblot par la perte de méthylation de H3K4.

2.2. Croisement, sporulation et dissection

Des cellules *MATa* sont mélangées à des cellules *MAT α* sur milieu YPD. Environ 4h après, les cellules diploïdes sont isolées par micromanipulation sur milieu YPD. Après 2 à 3 jours d'incubation à 30°C, les cellules diploïdes sont étalées sur milieu riche GNA (5% D-Glucose ; 3% Difco nutrient broth ; 1% Difco yeast extract ; 2% Bacto agar) avant d'être étalées sur milieu de sporulation (1% KAc; 2% Agar) et incubées 4 jours à 25°C. Les spores des tétrades sont finalement isolés par micromanipulation après 20 mn de digestion à 30°C des asques à la zymolase 100T à 1mg/ml.

3. Extraction de l'ADN génomique

La lyse cellulaire se fait de façon mécanique avec des billes de verre en présence de 200 μ l de tampon lyse (Triton X-100 2% (v/v); SDS 1% (p/v); NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM) et 200 μ l de phénol-chloroforme-isoamyl alcool (25 :24 :1) pendant 30 min. 200 μ l de Tris-EDTA pH 8 (TE) sont ajoutés et les lysats sont centrifugés pendant 5min à 13000 rpm. Les protéines dénaturées forment un précipité à l'interface phénol-eau et l'ADN, qui reste en solution dans la phase aqueuse, est récupéré. Celui-ci est ensuite précipité par ajout de 1ml d'éthanol 95%. Un lavage à l'éthanol 70% est effectué avant la resuspension de l'ADN génomique dans 30 μ l de TE contenant de la RNase A (0,05 μ g/ μ l).

4. Mesure de la longueur des télomère par Southern Blot

10 μ l d'ADN génomique sont digérés dans 30 μ l de Tampon de digestion par l'enzyme de restriction XhoI. Le site XhoI est présent dans une région subtélomérique conservée chez plus des 2/3 des chromosomes. La migration de l'ADN génomique est réalisée

sur gel d'agarose 1,2% puis dénaturé dans de la soude à 0,4N avant d'être transféré sur une membrane de nylon HYBOND-N+ Amersham 0,45µm.

Le fragment d'ADN utilisé pour la synthèse de la sonde a été libérée du plasmide sp100 après digestion par EcoRI puis purifié sur gel grâce au kit "QIAquick Gel Extraction" de chez Qiagen. Après une étape de dénaturation pendant 5 min à 95°C le fragment est marqué par la sous-unité klenow de l'ADN polymérase, en présence d'héxamères et de dNTP dont le dCTP est marqué radioactivement au phosphore 32 en position α (dCTP- α ³²P). La membrane est lavée dans du tampon phosphate 50mM pH 6,5 puis incubée 20 min à 55°C dans du tampon Church de pré-hybridation (0,5M de tampon phosphate pH 7, 7% de SDS, 1 mM de EDTA, 0,1% BSA) avant d'être mise en présence de la sonde radioactive pendant une nuit à 55°C. Après deux lavages de 20 min à 55°C dans du tampon Church de lavage (40 mM tampon phosphate pH 7 à 7,2; 1% SDS; 1 mM EDTA) la membrane est exposée face à un écran pendant une nuit puis révélée au PhosphorImager (Typhoon, Amersham).

5. Extraction protéiques et Western blot.

La méthylation de H3K4 est analysée par Western blot avec des anticorps obtenus au laboratoire spécifiques de la lysine 4 di- et tri-méthylée. L'extraction des histones est réalisée à partir de 1ml de culture saturée de levures qui sont mises en présence de 20 µl de soude NaOH 10N et incubés 10 min dans la glace. 50 µl d'acide trichloro-acétique (TCA) 100% sont ensuite ajoutés et les échantillons sont incubés 10 min dans la glace. Après 10 min de centrifugation à 13000 rpm, le culot est resuspendu dans 50 µl de tampon Laemmli 1X (63 mM Tris HCl; 10% Glycerol; 2% SDS; 0.0025% bleu de Bromophenol, pH 6.8) et les protéines sont dénaturées 5 min à 95°C. Une électrophorèse SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide 15% est réalisée puis les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose PROTRAN 0,2 µm. La membrane est saturée 30mn dans une solution 5% PBS-lait puis incubée durant 1h avec l'anticorps polyclonal de lapin (anti-H3K4me2 ou anti-H3K4me3). Après plusieurs lavages, la membrane est incubée 45 min en présence d'un anticorps secondaire fluorescent anti-lapin. La méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est révélée grâce à l'imageur infrarouge ODYSSEY (LI.COR Bioscience).

L'extraction des grosses protéines telles que Set1myc et Pif1myc est réalisée à partir d'1ml de culture. Les cellules sont lysées de façon mécanique dans 50 à 200µl de TCA20% en présence d'un même volume de billes de verres pendant 5 min. Le lysat est récupéré et les

billes sont lavées avec 100 à 400µl de TCA 5%. Après une centrifugation de 10mn à 13000 rpm les protéines sont resuspendues dans du tampon Laemmli 1X puis dénaturées 5mn à 95°C. Une électrophorèse SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide 7.5% est réalisée puis les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose PROTRAN 0,2 µm. Après saturation, la membrane est incubée en présence d'anticorps anti-myc (9E10) de chez Santa Cruz Biotechnology durant 1h puis en présence d'un anticorps secondaire fluorescent anti-souris.

6. Méthode de CoImmunoPrécipitation Pif1-myc/RPA

Pour les expériences en condition asynchrone, 50ml de culture en phase exponentielle de croissance sont récoltées et lavées dans du TrisHCl pH8.0.

Pour les expériences en condition synchrone, le gène *BAR1*, qui code une protéase responsable de la dégradation de l'α-facteur a été délété pour permettre une meilleure synchronisation (Manney, 1983 ; Nath, 1993). Les cellules sont cultivées jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,6 environ. L'α-facteur est alors ajouté à une concentration finale de 100 ng/mL. La synchronisation des cellules en G1 est suivie par microscopie. Lorsque plus de 95% des cellules sont arrêtées en G1, les cellules sont lavées puis relâchées dans du YPD. La relâche constitue le temps 0 de l'expérience. Aux temps 0, puis toutes les 15 minutes, 1 mL de culture est prélevé pour l'analyse du cycle cellulaire au FACS, et 50 mL pour réaliser la CoIP.

Les cellules sont lysées de façon mécanique dans du tampon TMG50 (10mM TrisHCl pH8.0; 1mM MnCl₂; 10% glycérol; 50mM NaCl; 0.1mM DTT) contenant des inhibiteurs de protéases (Calbiochem/VWR) et MG132 (Sigma Aldrich) en présence de 500µl de billes de verre. 5 cycles de 20s à 5 m/s sont réalisés (FastPrep MP Biomedicals). Après 15mn de centrifugation à 13000rpm, le surnageant est récupéré et les protéines sont dosées par la méthode de Bradford. 20µl de lysat (input) sont prélevés auxquels sont ajoutés 20µl de tampon Laemmli 2X, et le reste est utilisé pour l'immunoprécipitation. 0.5% de Tween20 et 2.5µl d'anticorps anti-myc (9E10) sont ajoutés à chaque échantillon avant d'être incubés durant une nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, 10µl de billes magnétiques couplées à des protéines G (Dynabeads Protein G d'Invitrogen) préalablement équilibrées dans du TMG50; 0.5% Tween20 sont ajoutés à chaque échantillon puis incubés 4h à 4°C sous agitation. Les billes sont finalement lavées 3 fois dans du TMG50; 0.5% Tween20 et une fois en TMG50 avant d'être resuspendues dans du Tampon Laemmli 1X puis dénaturées 5min à 95°C. La

totalité des IP et 20µl d'Input sont chargés sur gel acrylamide 12.5% puis transférés sur membrane de nitrocellulose PROTRAN 0,2 µm. La protéine Pif1myc est révélée par l'anticorps monoclonal anti-myc (9E10) (Santa Cruz Biotechnology). Les protéines Rfa1 et Rfa2 sont révélées par des anticorps polyclonaux anti-Rfa1 et anti-Rfa2 cordialement fournis par Steve Brill.

7. Analyse de la phosphorylation de Pif1

Le shift de phosphorylation de Pif1 est induit par ajout de HU 100mM et MMS 0.02% dans 50 ml de culture en phase exponentielle de croissance. Après 2h d'induction de dommages à l'ADN, les cellules sont récoltées et lavées dans de l'eau. La lyse est effectuée de façon mécanique avec 500µl de billes de verres, en présence de 500µl de tampon de lyse (25mM Hepes pH7.5; 1mM EDTA; 0.1% Igepal; 50mM NaF; 50mM sodium glycérophosphate) auquel sont ajoutés extemporanément 800mM KCl et des inhibiteurs de protéases (Calbiochem/VWR) et MG132 (Sigma Aldrich). 5 cycles de 20s à 5 m/s sont réalisés (FastPrep MP Biomedicals). Après 15mn de centrifugation à 13000rpm, le surnageant est récupéré et les protéines sont dosées par la méthode de Bradford. 20µl de lysat (input) sont prélevés auxquels sont ajoutés 20µl de tampon Laemmli 2X, et le reste est utilisé pour l'immunoprécipitation. 2.5µl d'anticorps anti-myc (9E10) sont ajoutés à chaque échantillon avant d'être incubés sur la nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, 10µl de billes magnétiques couplées à des protéines G (Dynabeads Protein G d'Invitrogen) préalablement équilibrées dans le tampon de lyse sont ajoutés à chaque échantillon puis incubés 4h à 4°C sous agitation. Les billes sont finalement lavées 3 fois en tampon de lyse puis une fois en tampon NEB3 pH7.9 (50mM TrisHCl; 10mM MgCl₂; 100mM NaCl; 1mM DTT).

Les protéines immunoprécipitées sont traitées avec 0.25µl de lambda phosphatase (Ozyme) en présence 1µl de Tampon NEB 1X; 1µl de MnCl₂ dans un volume final de 10µl. Après une incubation d'1h à 30°C, 10µl de tampon Laemmli 2X sont ajoutés et les protéines sont dénaturées 5mn à 95°C. La totalité des IP et 20µl d'Input sont chargés sur gel acrylamide 7.5% puis transférés sur membrane de nitrocellulose PROTRAN 0,2 µm. La protéine Pif1myc est révélée par l'anticorps monoclonal anti-myc (9E10).

8. Méthode de CoImmunoPrécipitation Pif1-myc/TLC1 et analyse ARN

La culture ainsi que la lyse cellulaire, lavages et incubation des anticorps sont réalisés de la même façon que ce décrit pour la CoIP Pif1/RPA. 1µl/ml d'inhibiteurs de RNase ("RNase out" d'Invitrogen) sont en plus ajoutés dans le tampon de lyse. Les complexes immunoprécipités avec les billes magnétiques sont incubés 30 minutes à 37°C en présence de 0.4mg/ml de protéinase K dans 50µl de solution 10mM TrisHCl pH8.0; 10mM EDTA; 1% SDS; 100mM NaCl. 5 µl d'Input prélevés au préalable sont traités de la même façon. Les ARN sont finalement purifiés sur colonnes grâce au kit "NucleoSpin RNA/protein" de chez Macherey-Nagel puis rétro-transcrits grâce au kit "First Strand Synthesis Using Superscript II RT" d'Invitrogen. L'utilisation de "Random primers" garantit la rétrotranscription de tous les ARN présents. L'ADNc obtenu est finalement analysé par qPCR grâce au mix "SYBR Premix Ex Taq" de chez Takara. Les ADNc correspondant à *TLC1* et à l'ARNm du gène *GAL2* sont amplifiés en utilisant les amorces présentées dans le Tableau 5.

9. Méthode d' ImmunoPrécipitation de la Chromatine associée à Pif1myc après induction de cassure HO

L'étude des cassures double brin de l'ADN a été réalisée dans le background JKM179. Après une préculture en milieu YPD, les cellules sont cultivées en milieu YPLGg [1% (w/v) yeast extract (Difco Laboratories), 2% (w/v) bactopeptone (Difco Laboratories), 2% (v/v) lactic acid (Fluka), 3% (v/v) glycerol, and 0.05% (w/v) glucose (Fluka)]. L'induction de l'endonucléase HO sous le contrôle du promoteur *GAL10* est faite par ajout de 2% de galactose dans le milieu lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance. 50ml de cellules sont prélevées aux temps t0; 30mn; 1h; 2h et 3h après l'ajout de galactose pour la ChIP et 10ml pour la vérification des coupures HO par Southernblot qui sera décrite dans la partie suivante.

Les 50 ml de cellules prélevées sont fixées dans du formaldéhyde 1% pendant 20mn avant d'être lavées 3 fois en TBS 1X. Les cellules sont lysées de façon mécanique en présence de 500µl de billes de verres, dans 500µl de tampon contenant 50mM Hepes-KOH pH7.5; 140mM NaCl; 1mM EDTA; 1% TritonX-100; 0.01% Na-deoxycholate; Ci et MG132. La lyse est effectuée au FastPrep par 4 cycles de 20s à 6.5m/s. Après 5mn de sonication (20s ON/ 10s OFF) les échantillons sont centrifugés 20mn à 13000rpm puis les protéines récupérées dans le surnageant sont dosées par la méthode de Bradford. 10µl de lysat (input) sont prélevés, et le

reste est utilisé pour l'immunoprécipitation. 2.5µl d'anticorps anti-myc (9E10) sont ajoutés à chaque échantillon avant d'être incubés sur la nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, 10µl de billes magnétiques couplées à des protéines G (Dynabeads Protein G d'Invitrogen) préalablement équilibrées dans le tampon de lyse sont ajoutées à chaque échantillon puis incubés 4h à 4°C sous agitation. Les billes sont finalement lavées 2 fois en tampon de lyse, 2fois en tampon de lyse + 360mM NaCl, 2 fois en tampon de lavage (10mM TrisHCl pH8.0; 250mM LiCl; 0.5% NP-40(Igepal); 0.5% Na-deoxycholate) et une fois avec du TE 1X.

Les protéines sont éluées par ajout de 30µl de tampon d'éluion (50mM TrisHCl pH8.0; 10mM EDTA; 1% SDS) et incubation 10 mn à 65°C. Le reverse du crosslink des échantillons d'IP et Input est réalisé par ajout de TE/SDS (10mM TrisHCl pH8.0; 1mM EDTA; 1%SDS) pour un volume final de 100µl et incubation une nuit à 65°C. Après traitement des échantillons à la protéinase K à 0.4mg/ml pendant 4h à 37°C, les ADN sont purifiés grâce au kit "MSB spin PCRapace" d'Eurobio.

L'ADNc obtenu est finalement analysé par qPCR grâce au mix "SYBR Premix Ex Taq" de chez Takara. L'ADN spécifique de la cassure HO localisée au site MAT ainsi que l'ADN du gène GAL2 sont amplifiés en utilisant les couples d'amorces présentés dans le Tableau 5

Gène	Amorce 5'	Amorce 3'	Taille du fragment
<i>TLC1</i>	CTCGATGGTGAAGAGATAGT	CATAAAGTGACAGCGCTTAG	500 pb
<i>MAT</i>	TCACAGGATAGCGTCTGGAA	TCAGCGAGCAGAGAAGACAA	160 pb
<i>GAL2</i>	GTTAAGCCCTTCCCATCTCAA	ATCTCCACATTTTAGCCTGCG	146 pb

Tableau 5 Séquence des amorces utilisées en qPCR. Les séquences sont présentées de 5' vers 3'

10. Analyse par Southern Blot des cassures HO induites

A partir des 10ml de culture prélevés aux temps t0; 30mn; 1h; 2h et 3h, l'ADN génomique est extrait selon le protocole présenté en partie 3 puis digéré par l'enzyme de restriction StyI pendant une nuit à 37°C. Un southernblot est ensuite réalisé selon le protocole décrit dans la partie 4. Les amorces décrites par Wang et Haber en 2004 ont permis de synthétiser une sonde 0.2kb distale.

11. Mesure de l'instabilité du minisatellite CEB1

Les cellules sont mises en culture dans 5 ml de YPD pendant 7 à 8 générations avant d'être étalées en colonies individuelles (~200cell/boîte) sur milieu YPD et incubées 2-3 jours à 30°C. Les colonies obtenues sont ensuite inoculées individuellement dans 5ml de YPD pendant une nuit à 30°C. Le culot cellulaire obtenu est resuspendu dans 500µl de solution contenant 1M Sorbitol; 0.1M EDTA et 0.3mg/ml zymolase 20T et incubé 1h à 37°C. Après 2min de centrifugation à 8000rpm, le culot est resuspendu dans 500µl de solution contenant 50mM Tris pH7.4 et 20mM EDTA. 25µl de SDS20% et 5µl de protéinase K à 20mg/ml sont ajoutés puis les échantillons sont incubés 30mn à 65°C. Après ajout de 200µl de KAc 5M les échantillons sont incubés 60mn dans la glace puis centrifugés 5 mn à 13000rpm. Le surnageant est récupéré et transféré dans 700µl d'isopropanol. Après lavage du culot à l'EtOH 70°, l'ADN est resuspendu dans 50 à 100µl de TE contenant de la RNase A (0,05 µg/µl).

Les minisatellites CEB1-1.8 en orientation I et II sont digérés par les enzymes de restriction ApaI/XhoI et ApaI/NcoI respectivement avant de migrer sur gel d'agarose 0.8% à 53V pendant 15h.

La sonde spécifique du minisatellite a été obtenue à partir de la digestion par EcoRI du plasmide pGEM-T Easy vector de promega qui contient un petit allele de CEB1 de 600 pb.

12. Mesure de la résection

Les cellules dérivées de la souche JKM179 sont mises en culture en milieu YPLGg et bloquées en phase G2 par ajout de 10µg/ml de Nocodazole. Une fois les cellules bloquées en G2, l'ajout de 2% de galactose permet l'induction de l'endonucléase HO. Après digestion de l'ADN génomique par l'enzyme de restriction SspI, la résection se produisant au locus *MAT* est analysée sur gel d'agarose en condition alcaline (50mM NaOH; 0.1mM EDTA). Les amorces décrites par Wang et Haber en 2004 ont permis de synthétiser une sonde 0.2kb distale.

Background	Génotype	Source
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	EUROSCARF
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; bre1::KANMX4</i>	EUROSCARF
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; bre2::KANMX4</i>	EUROSCARF
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; sdc1::KANMX4</i>	EUROSCARF
BY4141	<i>mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; swd1::KANMX4</i>	EUROSCARF
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; swd3::KANMX4</i>	EUROSCARF
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; spp1::KANMX4</i>	EUROSCARF
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; sir3::KANMX4</i>	EUROSCARF
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; pif1::KANMX4</i>	EUROSCARF
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ku70::KANMX4</i>	EUROSCARF
BY4141	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; mre11::KANMX4</i>	EUROSCARF
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; sir3::KANMX4 set1::NAT</i>	Ce travail
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; pif1::KANMX4 set1::NAT</i>	Ce travail
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ku70::KANMX4 set1::NAT</i>	Ce travail
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; set1::NAT</i>	Ce travail
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; set1::KAN</i>	Ce travail
BY4141	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; set1::HPH</i>	Ce travail
BY4141	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; set1-G951S</i>	Ce travail
BY4141	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; yku80-135i</i>	Stellwagen A.
BY4141	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; yku80-135i set1::NAT</i>	Ce travail
BY4141	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; rad53-K227A</i>	Ce travail
BY4141	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; rad53-K227A set1::NAT</i>	Ce travail
BY4141	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; mre11::KAN set1::NAT</i>	Ce travail
S288C	<i>MAT a; ura3-52; his3Δ20; leu2Δ; trp1Δ63; lys2-128δ; (hht1-hhf1)::LEU2; (hht2-hhf2)::HIS3 + pRS314-HHT2-HHF2</i>	Morillon A.
S288C	<i>MAT a; ura3-52; his3Δ20; leu2Δ; trp1Δ63; lys2-128δ; (hht1-hhf1)::LEU2; (hht2-hhf2)::HIS3 + pRS314-hht2K4R-HHF2</i>	Morillon A.
S288C	<i>MAT a; ura3-52; his3Δ20; leu2Δ; trp1Δ63; lys2-128δ; (hht1-hhf1)::LEU2; (hht2-hhf2)::HIS3 + pRS314-HHT2-HHF2; set1::NAT</i>	Ce travail
S288C	<i>MAT a; ura3-52; his3Δ20; leu2Δ; trp1Δ63; lys2-128δ; (hht1-hhf1)::LEU2; (hht2-hhf2)::HIS3 + pRS314-hht2K4R-HHF2 set1::NAT</i>	Ce travail
LPY917	<i>MATa ade2-101; trp1Δ1; leu2Δ1; his3Δ-200; lys2-801; TELadh4::URA3</i>	Géli V.
LPY917	<i>MATa ade2-101; trp1Δ1; leu2Δ1; his3Δ-200; lys2-801; TELadh4::URA3; sml1::TRP</i>	Géli V.

LPY917	<i>MATa ade2-101; trp1Δ1; leu2Δ1; his3Δ-200; lys2-801; TELadh4::URA3; sml1::TRP; set1::HIS3</i>	Géli V.
LPY917	<i>MATa ade2-101; trp1Δ1; leu2Δ1; his3Δ-200; lys2-801; TELadh4::URA3; sml1::TRP; mec1::KAN</i>	Géli V.
LPY917	<i>MATa ade2-101; trp1Δ1; leu2Δ1; his3Δ-200; lys2-801; TELadh4::URA3; sml1::TRP; mec1::KAN; set1::HIS3</i>	Géli V.
LPY917	<i>MATa ade2-101; trp1Δ1; leu2Δ1; his3Δ-200; lys2-801; TELadh4::URA3; sml1::TRP; mec1::KAN; set1::HIS3; tel1::LEU2</i>	Géli V.
LPY917	<i>MATa ade2-101; trp1Δ1; leu2Δ1; his3Δ-200; lys2-801; TELadh4::URA3; sml1::TRP; set1::HIS3; tel1::LEU2</i>	Géli V.
LPY917	<i>MATa ade2-101; trp1Δ1; leu2Δ1; his3Δ-200; lys2-801; TELadh4::URA3; sml1::TRP; tel1::LEU2</i>	Géli V.
LPY917	<i>MATa ade2-101; trp1Δ1; leu2Δ1; his3Δ-200; lys2-801; TELadh4::URA3; set1::HIS3; tel1::LEU2</i>	Géli V.
W303	<i>MAT a ura3-52; trp1Δ2; leu2-3_112; his3-11; ade2-i; can1-100</i>	Géli V.
W303	<i>MAT a ura3-52; trp1Δ2; leu2-3_112; his3-11; ade2-i; can1-100; rif1::NAT</i>	Marcand S.
W303	<i>MAT a ura3-52; trp1Δ2; leu2-3_112; his3-11; ade2-i; can1-100; rif2::HPH</i>	Marcand S.
W303	<i>MAT a his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; rif1::NAT set1::KAN</i>	Ce travail
W303	<i>MAT a ura3-52; trp1Δ2; leu2-3_112; his3-11; ade2-i; can1-100; rif2::HPH set1::KAN</i>	Ce travail
W303	<i>MAT a ura3-52; trp1Δ2; leu2-3_112; his3-11; ade2-i; can1-100; rif1::NAT; rif2::HPH</i>	Marcand S.
W303	<i>MAT a ura3-52; trp1Δ2; leu2-3_112; his3-11; ade2-i; can1-100; rif1::NAT; rif2::HPH; set1::KAN</i>	Ce travail
W303	<i>MAT a; trp1-1; leu2-3; leu2-112; his3-11; his3-15, RAD5+, CAN1+, ARS305-CEB1-1.8</i>	Lopes J.
W303	<i>MAT a; trp1-1; leu2-3; leu2-112; his3-11; his3-15, RAD5+, CAN1+, ARS305-CEB1-1.8inv.</i>	Lopes J.
W303	<i>MAT a; trp1-1; leu2-3; leu2-112; his3-11; his3-15, RAD5+, CAN1+, ARS305-CEB1-1.8; rfa1-D228Y</i>	Ce travail
JKM179	<i>MAT alpha; ade1-100; leu2-3,112; lys5; trp1::hisG; ura3-52; ade3::GAL10::HO; Δho; Δhml1::ADE1; Δhmr::ADE1</i>	Ce travail
JKM179	<i>MAT alpha; ade1-100; leu2-3,112; lys5; trp1::hisG; ura3-52; ade3::GAL10::HO; Δho; Δhml1::ADE1; Δhmr::ADE1; set1::KANMX6</i>	Ce travail
JKM179	<i>MAT alpha; ade1-100; leu2-3,112; lys5; trp1::hisG; ura3-52; ade3::GAL10::HO; Δho; Δhml1::ADE1; Δhmr::ADE1; est2::NAT + pVL291-EST2</i>	Gilson E.
JKM179	<i>MAT alpha; ade1-100; leu2-3,112; lys5; trp1::hisG; ura3-52; ade3::GAL10::HO; Δho; Δhml1::ADE1; Δhmr::ADE1; est2::NAT + pVL291-est2-up34</i>	Gilson E.
JKM179	<i>MAT alpha; ade1-100; leu2-3,112; lys5; trp1::hisG; ura3-52; ade3::GAL10::HO; Δho; Δhml1::ADE1; Δhmr::ADE1; est2::NAT + pVL291-EST2; rfa1-D228Y</i>	Ce travail
JKM179	<i>MAT alpha; ade1-100; leu2-3,112; lys5; trp1::hisG; ura3-52; ade3::GAL10::HO; Δho; Δhml1::ADE1; Δhmr::ADE1; est2::NAT + pVL291-est2-up34; rfa1-D228Y</i>	Ce travail

Tableau 6 Souches de levures utilisées dans ce travail

pFA6-natNT2	plasmide portant la séquence du gène codant la résistance à la nouséothricine
pFA6-hphNT1	plasmide portant la séquence du gène codant la résistance à l'hygromycine
pCH3	Digestion du plasmide contenant une cassette de résistance KAN, par EcoRI pour muter l'activité kinase de Rad53 par la mutation K227A
pK et pAN	Plasmides digérés par l'enzyme de restriction NotI et utilisés pour la délétion du gène MEC1
pVL291	porte la séquence complète de <i>EST2</i> et le gène de synthèse de l'uracile (V.Lundblad).
pVL291- <i>est2up34</i>	la mutation <i>est2-up34</i> a été intégrée dans pVL291 via le kit "QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit" de Stratagene, suivant les instructions du fabricant (E.Gilson)
sp100	Plasmide digéré par EcoRI pour les synthèse de la sonde TG1-3
pGEM-T Easy vector CEB1	Plasmide digéré par EcoRI pour les synthèse de la sonde CEB1

Tableau 7 Plasmides utilisés dans ce travail

	Amorce 5'	Amorce 3'
Délétion de <i>SET1</i>	GGTAACATTCCTTATTTGTTGAATCTTT ATAAGAGGTCTCTGCGTTTAGCGGATCCC CGGGTTAATTAA	AGCAACGATATGTTAAATCAGGAAGCTC CAAACAAATCAATGTATCATCGCATCGA TGAATTCGAGCTCG
Délétion de <i>PIF1</i>	CTGGTATTGCCTCGATATTTTTATTTGTA ATATTATCCATTGAGCGCGGATCCCCGGG TTAATTAA	GATTATTATAGCAGTTTGTATTCTATAT AACTATGTGTATTAATATGTACGAATTC GAGCTCGTTTAAAC
Tag de <i>PIF1</i>	TGGTTTCCGACGAACCTCGTGGTCAGGA TACCGAAGACCACATCTTAGAACGGATCC CCGGGTTAATTAA	GATTATTATAGCAGTTTGTATTCTATAT AACTATGTGTATTAATATGTACGAATTC GAGCTCGTTTAAAC
Sonde HO distale	CCTGGTTTTGGTTTTGTAGAGTGG	GAGCAAGACGATGGGGAGTTTC
Screen insertion CEB1-1.8	CGGACATGTACAGAGCTCGA (CEB1-1.8)	GCACCCAATGCATGTGTAC (ChrIII)

Tableau 8 Oligonucléotides utilisés dans ce travail

BIBLIOGRAPHIE

- Adcock IM, Lee K-Y. 2006. Abnormal histone acetylase and deacetylase expression and function in lung inflammation. *Inflamm. res.* 55:311-321.
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. 1964. 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.
- Amiard S, Doudeau M, Pinte S, Poulet A, Lenain C, Faivre-Moskalenko C, Angelov D, Hug N, Vindigni A, Bouvet P, et al. 2007. A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:147-154.
- Anbalagan S, Bonetti D, Lucchini G, Longhese MP. 2011. Rif1 supports the function of the CST complex in yeast telomere capping. *PLoS Genet.* 7:e1002024.
- Angus-Hill ML, Dutnall RN, Tafrov ST, Sternglanz R, Ramakrishnan V. 1999. Crystal structure of the histone acetyltransferase Hpa2: a tetrameric member of the Gcn5-related N-acetyltransferase superfamily. *Journal of Molecular Biology* 294:1311-1325.
- Amerić M, Lingner J. 2007. Tel1 kinase and subtelomere-bound Tbf1 mediate preferential elongation of short telomeres by telomerase in yeast. *EMBO Rep.* 8:1080-1085.
- Autexier C, Lue NF. 2006. The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase. *Annu. Rev. Biochem.* 75:493-517.
- Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriantuli L, Giulotto E, Lingner J. 2007. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 318:798-801.
- Bae S-H, Bae K-H, Kim J-A, Seo Y-S. 2001. RPA governs endonuclease switching during processing of Okazaki fragments in eukaryotes. *Nature* 412:456-461.
- Banerjee S, Smith S, Myung K. 2006. Suppression of gross chromosomal rearrangements by yKu70-yKu80 heterodimer through DNA damage checkpoints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:1816 -1821.
- Baumann P, Cech TR. 2001. Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 292:1171-1175.
- Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, Kouzarides T, Schreiber SL. 2002. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8695-8700.
- Bianchi A, Shore D. 2007a. Increased association of telomerase with short telomeres in yeast. *Genes Dev.* 21:1726-1730.
- Bianchi A, Shore D. 2007b. Early replication of short telomeres in budding yeast. *Cell* 128:1051-1062.
- Bilaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E. 1997. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* 17:236-239.
- Biswas D, Dutta-Biswas R, Mitra D, Shibata Y, Strahl BD, Formosa T, Stillman DJ. 2006.

- Opposing roles for Set2 and yFACT in regulating TBP binding at promoters. *EMBO J* 25:4479-4489.
- Boa S, Coert C, Patterton H. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* Set1p is a methyltransferase specific for lysine 4 of histone H3 and is required for efficient gene expression. *Yeast* 20:827-835.
- Bochkareva E, Belegu V, Korolev S, Bochkarev A. 2001. Structure of the major single-stranded DNA-binding domain of replication protein A suggests a dynamic mechanism for DNA binding. *EMBO J.* 20:612-618.
- Bonetti D, Clerici M, Anbalagan S, Martina M, Lucchini G, Longhese MP. 2010. Shelterin-Like Proteins and Yku Inhibit Nucleolytic Processing of *Saccharomyces cerevisiae* Telomeres. *PLoS Genet* 6.
- Bonetti D, Clerici M, Manfrini N, Lucchini G, Longhese MP. 2010. The MRX complex plays multiple functions in resection of Yku- and Rif2-protected DNA ends. *PLoS ONE* 5:e14142.
- Bonetti D, Martina M, Clerici M, Lucchini G, Longhese MP. 2009. Multiple Pathways Regulate 3' Overhang Generation at *S. cerevisiae* Telomeres. *Molecular Cell* 35:70-81.
- Borde V, Robine N, Lin W, Bonfils S, Géli V, Nicolas A. 2009. Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO J* 28:99-111.
- Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koonin EV. 1997. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J* 11:68-76.
- Boule J-B, Vega LR, Zakian VA. 2005. The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. *Nature* 438:57-61.
- Boulton SJ, Jackson SP. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J.* 15:5093-5103.
- Boulton SJ, Jackson SP. 1998. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J* 17:1819-1828.
- Bradbury EM, Inglis RJ, Matthews HR, Sarnier N. 1973. Phosphorylation of very-lysine-rich histone in *Physarum polycephalum*. Correlation with chromosome condensation. *Eur. J. Biochem* 33:131-139.
- Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. 1997. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* 17:231-235.
- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD. 1996. Tetrahymena Histone Acetyltransferase A: A Homolog to Yeast Gcn5p Linking Histone Acetylation to Gene Activation. *Cell* 84:843-851.
- Bryk M, Banerjee M, Murphy M, Knudsen KE, Garfinkel DJ, Curcio MJ. 1997. Transcriptional silencing of Ty1 elements in the RDN1 locus of yeast. *Genes & Development*

11:255 -269.

Budd ME, Reis CC, Smith S, Myung K, Campbell JL. 2006b. Evidence suggesting that Pif1 helicase functions in DNA replication with the Dna2 helicase/nuclease and DNA polymerase delta. *Mol. Cell. Biol.* 26:2490-2500.

Burgers PMJ. 2009. Polymerase Dynamics at the Eukaryotic DNA Replication Fork. *Journal of Biological Chemistry* 284:4041 -4045.

Camblong J, Beyrouthy N, Guffanti E, Schlaepfer G, Steinmetz LM, Stutz F. 2009. Trans-acting antisense RNAs mediate transcriptional gene cosuppression in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* 23:1534-1545.

Camblong J, Iglesias N, Fickentscher C, Dieppo G, Stutz F. 2007. Antisense RNA stabilization induces transcriptional gene silencing via histone deacetylation in *S. cerevisiae*. *Cell* 131:706-717.

Caslini C, Connelly JA, Serna A, Broccoli D, Hess JL. 2009. MLL Associates with Telomeres and Regulates Telomeric Repeat-Containing RNA Transcription. *Mol Cell Biol* 29:4519-4526.

Chandra A, Hughes TR, Nugent CI, Lundblad V. 2001. Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes & Development* 15:404 -414.

Chang M, Arneric M, Lingner J. 2007. Telomerase repeat addition processivity is increased at critically short telomeres in a Tel1-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 21:2485-2494.

Chapon C, Cech TR, Zaug AJ. 1997. Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *RNA* 3:1337 -1351.

Chen C, Kolodner RD. 1999. Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nat Genet* 23:81-85.

Chen C-C, Carson JJ, Feser J, Tamburini B, Zabaronick S, Linger J, Tyler JK. 2008. Acetylated lysine 56 on histone H3 drives chromatin assembly after repair and signals for the completion of repair. *Cell* 134:231-243.

Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang S-M, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR. 1999. Regulation of Transcription by a Protein Methyltransferase. *Science* 284:2174 -2177.

Cheng H, He X, Moore C. 2004. The Essential WD Repeat Protein Swd2 Has Dual Functions in RNA Polymerase II Transcription Termination and Lysine 4 Methylation of Histone H3. *Mol Cell Biol* 24:2932-2943.

Chuikov S, Kurash JK, Wilson JR, Xiao B, Justin N, Ivanov GS, McKinney K, Tempst P, Prives C, Gamblin SJ, et al. 2004. Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* 432:353-360.

Clarke AS, Lowell JE, Jacobson SJ, Pillus L. 1999. Esa1p Is an Essential Histone Acetyltransferase Required for Cell Cycle Progression. *Mol Cell Biol* 19:2515-2526.

- Cooper JP, Nimmo ER, Allshire RC, Cech TR. 1997. Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* 385:744-747.
- Corda Y, Schramke V, Longhese MP, Smokvina T, Paciotti V, Brevet V, Gilson E, Géli V. 1999. Interaction between Set1p and checkpoint protein Mec3p in DNA repair and telomere functions. *Nat Genet* 21:204-208.
- Couture J-F, Collazo E, Hauk G, Trievel RC. 2006. Structural basis for the methylation site specificity of SET7/9. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:140-146.
- Dehé P-M, Cooper JP. 2010. Fission yeast telomeres forecast the end of the crisis. *FEBS Letters* 584:3725-3733.
- Dehé P-M, Dichtl B, Schaft D, Roguev A, Pamblanco M, Lebrun R, Rodríguez-Gil A, Mkandawire M, Landsberg K, Shevchenko Anna, et al. 2006. Protein Interactions within the Set1 Complex and Their Roles in the Regulation of Histone 3 Lysine 4 Methylation. *Journal of Biological Chemistry* 281:35404 -35412.
- Dehé P-M, Géli V. 2006. The multiple faces of Set1. *Biochem. Cell Biol* 84:536-548.
- Dehé P-M, Pamblanco M, Luciano P, Lebrun R, Moinier D, Sendra R, Verreault A, Tordera V, Géli V. 2005. Histone H3 Lysine 4 Mono-methylation does not Require Ubiquitination of Histone H2B. *Journal of Molecular Biology* 353:477-484.
- Denchi EL. 2009. Give me a break: How telomeres suppress the DNA damage response. *DNA Repair* 8:1118-1126.
- DeZwaan DC, Freeman BC. 2009. The conserved Est1 protein stimulates telomerase DNA extension activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:17337 -17342.
- DICHTL B, AASLAND R, KELLER W. 2004. Functions for *S. cerevisiae* Swd2p in 3' end formation of specific mRNAs and snoRNAs and global histone 3 lysine 4 methylation. *RNA* 10:965-977.
- Diede SJ, Gottschling DE. 2001. Exonuclease activity is required for sequence addition and Cdc13p loading at a de novo telomere. *Current Biology* 11:1336-1340.
- Downs JA, Allard S, Jobin-Robitaille O, Javaheri A, Auger A, Bouchard N, Kron SJ, Jackson SP, Côté J. 2004. Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol. Cell* 16:979-990.
- Duquette ML, Handa P, Vincent JA, Taylor AF, Maizels N. 2004. Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes & Development* 18:1618 -1629.
- Emre NCT, Ingvarsdottir K, Wyce A, Wood A, Krogan NJ, Henry KW, Li K, Marmorstein R, Greenblatt JF, Shilatifard A, et al. 2005. Maintenance of low histone ubiquitylation by Ubp10 correlates with telomere-proximal Sir2 association and gene silencing. *Mol. Cell* 17:585-594.
- Eugster A, Lanzuolo C, Bonneton M, Luciano P, Pollice A, Pulitzer JF, Stegberg E, Berthiau A-S, Forstemann K, Corda Y, et al. 2006. The finger subdomain of yeast telomerase cooperates with Pif1p to limit telomere elongation. *Nat Struct Mol Biol* 13:734-739.

- Evans SK, Lundblad V. 1999. Est1 and Cdc13 as Comediators of Telomerase Access. *Science* 286:117 -120.
- Evans SK, Lundblad V. 2002. The Est1 Subunit of *Saccharomyces cerevisiae* Telomerase Makes Multiple Contributions to Telomere Length Maintenance. *Genetics* 162:1101 -1115.
- Faucher D, Wellinger RJ. 2010. Methylated H3K4, a Transcription-Associated Histone Modification, Is Involved in the DNA Damage Response Pathway. *PLoS Genet* 6.
- Faure V, Coulon S, Hardy J, Géli V. 2010. Cdc13 and Telomerase Bind through Different Mechanisms at the Lagging- and Leading-Strand Telomeres. *Molecular Cell* 38:842-852.
- Ferreira MG, Cooper JP. 2004. Two modes of DNA double-strand break repair are reciprocally regulated through the fission yeast cell cycle. *Genes Dev* 18:2249-2254.
- Forsberg EC, Bresnick EH. 2001. Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world*. *BioEssays* 23:820-830.
- Fouché N, Cesare AJ, Willcox S, Ozgür S, Compton SA, Griffith JD. 2006. The basic domain of TRF2 directs binding to DNA junctions irrespective of the presence of TTAGGG repeats. *J. Biol. Chem.* 281:37486-37495.
- Foury F, Kolodynski J. 1983. pif mutation blocks recombination between mitochondrial rho+ and rho- genomes having tandemly arrayed repeat units in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:5345-5349.
- Frank CJ, Hyde M, Greider CW. 2006. Regulation of Telomere Elongation by the Cyclin-Dependent Kinase CDK1. *Molecular Cell* 24:423-432.
- Fry M, Loeb LA. 1999. Human Werner Syndrome DNA Helicase Unwinds Tetrahelical Structures of the Fragile X Syndrome Repeat Sequence d(CGG) n. *Journal of Biological Chemistry* 274:12797 -12802.
- Fulton TB, Blackburn EH. 1998. Identification of *Kluyveromyces lactis* Telomerase: Discontinuous Synthesis along the 30-Nucleotide-Long Templating Domain. *Mol. Cell. Biol.* 18:4961-4970.
- Gao H, Cervantes RB, Mandell EK, Otero JH, Lundblad V. 2007. RPA-like proteins mediate yeast telomere function. *Nat Struct Mol Biol* 14:208-214.
- Gao H, Toro TB, Paschini M, Braunstein-Ballew B, Cervantes RB, Lundblad V. 2010. Telomerase Recruitment in *Saccharomyces cerevisiae* Is Not Dependent on Tel1-Mediated Phosphorylation of Cdc13. *Genetics* 186:1147 -1159.
- Gary JD, Lin W-J, Yang MC, Herschman HR, Clarke S. 1996. The Predominant Protein-arginine Methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 271:12585 -12594.
- Gasser SM, Cockell MM. 2001. The molecular biology of the SIR proteins. *Gene* 279:1-16.
- Gellert M, Lipsett MN, Davies DR. 1962. HELIX FORMATION BY GUANYLIC ACID. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48:2013-2018.

- Di Gennaro E, Bruzzese F, Caraglia M, Abruzzese A, Budillon A. 2004. Acetylation of proteins as novel target for antitumor therapy: Review article. *Amino Acids* [Internet] 26. Available from: <http://www.springerlink.com.gate1.inist.fr/content/u9nnc3p09cr3mhjy/>
- Giannattasio M, Lazzaro F, Plevani P, Muzi-Falconi M. 2005. The DNA Damage Checkpoint Response Requires Histone H2B Ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 Methylation by Dot1. *Journal of Biological Chemistry* 280:9879 -9886.
- Gillis AJ, Schuller AP, Skordalakes E. 2008. Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT. *Nature* 455:633-637.
- Gilson E, Geli V. 2007. How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:825-838.
- Giraud-Panis M-J, Pisano S, Poulet A, Du M-HL, Gilson E. 2010. Structural identity of telomeric complexes. *FEBS Letters* 584:3785-3799.
- Gordenin DA, Kunkel TA, Resnick MA. 1997. Repeat expansion [mdash] all in flap? *Nat Genet* 16:116-118.
- Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA. 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63:751-762.
- Gottschling DE. 2000. Gene silencing: two faces of SIR2. *Curr. Biol.* 10:R708-711.
- Goudsouzian LK, Tuzon CT, Zakian VA. 2006a. *S. cerevisiae* Tel1p and Mre11p Are Required for Normal Levels of Est1p and Est2p Telomere Association. *Molecular Cell* 24:603-610.
- Grandin N, Charbonneau M. 2007. Control of the yeast telomeric senescence survival pathways of recombination by the Mec1 and Mec3 DNA damage sensors and RPA. *Nucleic Acids Res* 35:822-838.
- Grandin N, Reed SI, Charbonneau M. 1997. Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev.* 11:512-527.
- Grant PA, Eberharter A, John S, Cook RG, Turner BM, Workman JL. 1999. Expanded Lysine Acetylation Specificity of Gen5 in Native Complexes. *Journal of Biological Chemistry* 274:5895 -5900.
- Gravel S, Larrivé M, Labrecque P, Wellinger RJ. 1998. Yeast Ku as a Regulator of Chromosomal DNA End Structure. *Science* 280:741 -744.
- Greenwell PW, Kronmal SL, Porter SE, Gassenhuber J, Obermaier B, Petes TD. 1995. TEL1, a gene involved in controlling telomere length in *S. cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene. *Cell* 82:823-829.
- Greider CW. 1991. Telomerase is processive. *Mol. Cell. Biol.* 11:4572-4580.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97:503-514.
- Grossi S, Puglisi A, Dmitriev PV, Lopes M, Shore D. 2004. Pol12, the B subunit of DNA

- polymerase alpha, functions in both telomere capping and length regulation. *Genes Dev.* 18:992-1006.
- Gunjan A, Verreault A. 2003. A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*. *Cell* 115:537-549.
- Gurley LR, D'Anna JA, Barham SS, Deaven LL, Tobey RA. 1978. Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur. J. Biochem* 84:1-15.
- Halbach A, Zhang H, Wengi A, Jablonska Z, Gruber IML, Halbeisen RE, Dehé P-M, Kemmeren P, Holstege F, Géli V, et al. 2009. Cotranslational assembly of the yeast SET1C histone methyltransferase complex. *EMBO J.* 28:2959-2970.
- Hammet A, Magill C, Heierhorst J, Jackson SP. 2007. Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast. *EMBO Rep* 8:851-857.
- Hardy CF, Sussel L, Shore D. 1992. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes & Development* 6:801 -814.
- Hassan AH, Prochasson P, Neely KE, Galasinski SC, Chandy M, Carrozza MJ, Workman JL. 2002. Function and Selectivity of Bromodomains in Anchoring Chromatin-Modifying Complexes to Promoter Nucleosomes. *Cell* 111:369-379.
- Haw R, Devi Yarragudi A, Uemura H. 2001. Isolation of a *Candida glabrata* homologue of RAP1, a regulator of transcription and telomere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18:1277-1284.
- Hector RE, Shtofman RL, Ray A, Chen B-R, Nyun T, Berkner KL, Runge KW. 2007. Tel1p preferentially associates with short telomeres to stimulate their elongation. *Mol. Cell* 27:851-858.
- Hershman SG, Chen Q, Lee JY, Kozak ML, Yue P, Wang L-S, Johnson FB. 2008. Genomic distribution and functional analyses of potential G-quadruplex-forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 36:144-156.
- Hirano Y, Fukunaga K, Sugimoto K. 2009. Rif1 and Rif2 Inhibit Localization of Tel1 to DNA Ends. *Molecular Cell* 33:312-322.
- Howe L, Auston D, Grant P, John S, Cook RG, Workman JL, Pillus L. 2001. Histone H3 specific acetyltransferases are essential for cell cycle progression. *Genes Dev* 15:3144-3154.
- Huber MD, Lee DC, Maizels N. 2002. G4 DNA unwinding by BLM and Sgs1p: substrate specificity and substrate-specific inhibition. *Nucleic Acids Res* 30:3954-3961.
- Hug N, Lingner J. 2006. Telomere length homeostasis. *Chromosoma* 115:413-425.
- Huppert JL, Balasubramanian S. 2007. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* 35:406-413.
- Iglesias N, Redon S, Pfeiffer V, Dees M, Lingner J, Luke B. 2011. Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast. *EMBO Rep.* 12:587-593.

- Ira G, Pelliccioli A, Balijja A, Wang X, Fiorani S, Carotenuto W, Liberi G, Bressan D, Wan L, Hollingsworth NM, et al. 2004. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* 431:1011-1017.
- Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. 2000. Glucocorticoid Receptor Recruitment of Histone Deacetylase 2 Inhibits Interleukin-1 β -Induced Histone H4 Acetylation on Lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 20:6891-6903.
- Jackson SP. 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23:687-696.
- Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080.
- Jin Y, Rodriguez AM, Stanton JD, Kitazono AA, Wyrick JJ. 2007. Simultaneous mutation of methylated lysine residues in histone H3 causes enhanced gene silencing, cell cycle defects, and cell lethality in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27:6832-6841.
- Johnson A, Li G, Sikorski TW, Buratowski S, Woodcock CL, Moazed D. 2009. Reconstitution of Heterochromatin-Dependent Transcriptional Gene Silencing. *Molecular Cell* 35:769-781.
- Jones B, Su H, Bhat A, Lei H, Bajko J, Hevi S, Baltus GA, Kadam S, Zhai H, Valdez R, et al. 2008. The Histone H3K79 Methyltransferase Dot1L Is Essential for Mammalian Development and Heterochromatin Structure. *PLoS Genet* 4.
- Kanoh J, Ishikawa F. 2001. spRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast. *Current Biology* 11:1624-1630.
- Kantake N, Sugiyama T, Kolodner RD, Kowalczykowski SC. 2003. The Recombination-deficient Mutant RPA (rfa1-t11) Is Displaced Slowly from Single-stranded DNA by Rad51 Protein. *Journal of Biological Chemistry* 278:23410 -23417.
- Keogh M-C, Kurdistani SK, Morris SA, Ahn SH, Podolny V, Collins SR, Schuldiner M, Chin K, Punna T, Thompson NJ, et al. 2005. Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* 123:593-605.
- Kim H-S, Brill SJ. 2003. MEC1-dependent phosphorylation of yeast RPA1 in vitro. *DNA Repair (Amst.)* 2:1321-1335.
- Kleff S, Andrulis ED, Anderson CW, Sternglanz R. 1995. Identification of a Gene Encoding a Yeast Histone H4 Acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 270:24674 -24677.
- Kouzarides T. 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Current Opinion in Genetics & Development* 12:198-209.
- Kuo M-H, Brownell JE, Sobel RE, Ranalli TA, Cook RG, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD. 1996. Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383:269-272.
- Lahaye A, Stahl H, Thines-Sempoux D, Foury F. 1991. PIF1: a DNA helicase in yeast mitochondria. *EMBO J* 10:997-1007.

- Lamarche BJ, Orazio NI, Weitzman MD. 2010. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Letters* 584:3682-3695.
- Larrivée M, LeBel C, Wellinger RJ. 2004. The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes & Development* 18:1391 -1396.
- Larson GP, Castanotto D, Rossi JJ, Malafa MP. 1994. Isolation and functional analysis of a *Kluyveromyces lactis* RAP1 homologue. *Gene* 150:35-41.
- Lazzaro F, Sapountzi V, Granata M, Pellicoli A, Vaze M, Haber JE, Plevani P, Lydall D, Muzi-Falconi M. 2008. Histone methyltransferase Dot1 and Rad9 inhibit single-stranded DNA accumulation at DSBs and uncapped telomeres. *EMBO J* 27:1502-1512.
- LeBel C, Wellinger RJ. 2004. [The structures at the termini of chromosomes: what is there hidden under the cap?]. *Med Sci (Paris)* 20:207-212.
- Lee J-S, Shukla A, Schneider J, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, Bhaumik SR, Shilatifard A. 2007. Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell* 131:1084-1096.
- Lee SE, Moore JK, Holmes A, Umez K, Kolodner RD, Haber JE. 1998. *Saccharomyces Ku70*, *mre11/rad50* and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* 94:399-409.
- van Leeuwen F, Gafken PR, Gottschling DE. 2002. Dot1p Modulates Silencing in Yeast by Methylation of the Nucleosome Core. *Cell* 109:745-756.
- Levy DL, Blackburn EH. 2004. Counting of Rif1p and Rif2p on *Saccharomyces cerevisiae* Telomeres Regulates Telomere Length. *Mol. Cell. Biol.* 24:10857-10867.
- Li B, Oestreich S, de Lange T. 2000. Identification of Human Rap1: Implications for Telomere Evolution. *Cell* 101:471-483.
- Li Q, Zhou H, Wurtele H, Davies B, Horazdovsky B, Verreault A, Zhang Z. 2008. Acetylation of histone H3 lysine 56 regulates replication-coupled nucleosome assembly. *Cell* 134:244-255.
- Li S, Makovets S, Matsuguchi T, Blethrow JD, Shokat KM, Blackburn EH. 2009a. Cdk1-Dependent Phosphorylation of Cdc13 Coordinates Telomere Elongation during Cell-Cycle Progression. *Cell* 136:50-61.
- Lieb JD, Liu X, Botstein D, Brown PO. 2001. Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat. Genet* 28:327-334.
- Lin J-J, Zakian VA. 1996. The *Saccharomyces CDC13* protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:13760 -13765.
- Lin W-J, Gary JD, Yang MC, Clarke S, Herschman HR. 1996. The Mammalian Immediate-early TIS21 Protein and the Leukemia-associated BTG1 Protein Interact with a Protein-arginine N-Methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 271:15034 -15044.

- Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. 1997. Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase. *Science* 276:561 -567.
- Liu D, O'Connor MS, Qin J, Songyang Z. 2004. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J. Biol. Chem.* 279:51338-51342.
- Liu Y, Kao H-I, Bambara RA. 2004. F *YAP* E *NDONUCLEASE* 1: A Central Component of DNA Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 73:589-615.
- Liu Y, Xu X, Singh-Rodriguez S, Zhao Y, Kuo M-H. 2005. Histone H3 Ser10 phosphorylation-independent function of Snf1 and Reg1 proteins rescues a *gcn5*- mutant in *HIS3* expression. *Mol. Cell. Biol* 25:10566-10579.
- Lo W-S, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu J-Y, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL. 2000. Phosphorylation of Serine 10 in Histone H3 Is Functionally Linked In Vitro and In Vivo to Gcn5-Mediated Acetylation at Lysine 14. *Molecular Cell* 5:917-926.
- Lopes J, Piazza A, Bermejo R, Kriegsman B, Colosio A, Teulade-Fichou M-P, Foiani M, Nicolas A. 2011. G-quadruplex-induced instability during leading-strand replication. *EMBO J.* 30:4033-4046.
- Lopes J, Ribeyre C, Nicolas A. 2006. Complex Minisatellite Rearrangements Generated in the Total or Partial Absence of Rad27/hFEN1 Activity Occur in a Single Generation and Are Rad51 and Rad52 Dependent. *Mol. Cell. Biol.* 26:6675-6689.
- Louis EJ, Haber JE. 1990. The subtelomeric Y' repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental system for repeated sequence evolution. *Genetics* 124:533-545.
- Louis EJ. 1995. The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11:1553-1573.
- Lue NF. 2004. Adding to the ends: what makes telomerase processive and how important is it? *BioEssays* 26:955-962.
- Luke B, Panza A, Redon S, Iglesias N, Li Z, Lingner J. 2008. The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 32:465-477.
- Lundblad V, Szostak JW. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57:633-643.
- Luo K, Vega-Palas MA, Grunstein M. 2002. Rap1-Sir4 binding independent of other Sir, yKu, or histone interactions initiates the assembly of telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev.* 16:1528-1539.
- Lustig AJ, Kurtz S, Shore D. 1990. Involvement of the silencer and UAS binding protein RAP1 in regulation of telomere length. *Science* 250:549-553.
- Macdonald N, Welburn JPI, Noble MEM, Nguyen A, Yaffe MB, Clynes D, Moggs JG, Orphanides G, Thomson S, Edmunds JW, et al. 2005. Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol. Cell* 20:199-211.
- Makovets S, Blackburn EH. 2009. DNA damage signalling prevents deleterious telomere

addition at DNA breaks. *Nat Cell Biol* 11:1383-1386.

Marcand S, Brevet V, Gilson E. 1999. Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation. *EMBO J* 18:3509-3519.

Marcand S, Wotton D, Gilson E, Shore D. 1997. Rap1p and telomere length regulation in yeast. *Ciba Found. Symp* 211:76-93; discussion 93-103.

Martín V, Du L-L, Rozenzhak S, Russell P. 2007. Protection of telomeres by a conserved Stn1-Ten1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:14038-14043.

Masumoto H, Hawke D, Kobayashi R, Verreault A. 2005. A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature* 436:294-298.

McCulley JL, Petes TD. 2010. Chromosome rearrangements and aneuploidy in yeast strains lacking both Tellp and Mec1p reflect deficiencies in two different mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:11465-11470.

McGee JS, Phillips JA, Chan A, Sabourin M, Paeschke K, Zakian VA. 2010. Reduced Rif2 and lack of Mec1 target short telomeres for elongation rather than double-strand break repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17:1438-1445.

Miller KM, Rog O, Cooper JP. 2006. Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature* 440:824-828.

Miller T, Krogan NJ, Dover J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Johnston M, Greenblatt JF, Shilatifard A. 2001. COMPASS: A complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12902-12907.

Milne GT, Jin S, Shannon KB, Weaver DT. 1996. Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16:4189-4198.

Mimitou EP, Symington LS. 2008. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* 455:770-774.

Min J, Zhang Y, Xu R-M. 2003. Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev* 17:1823-1828.

Miyoshi T, Kanoh J, Saito M, Ishikawa F. 2008. Fission yeast Pot1-Tpp1 protects telomeres and regulates telomere length. *Science* 320:1341-1344.

Mizzen CA, Yang X-J, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T, et al. 1996. The TAFII250 Subunit of TFIID Has Histone Acetyltransferase Activity. *Cell* 87:1261-1270.

Mohaghegh P, Karow JK, Brosh RM Jr, Bohr VA, Hickson ID. 2001. The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res.* 29:2843-2849.

Moore JK, Haber JE. 1996. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.*

Cell. Biol 16:2164-2173.

Moretti P, Freeman K, Coodly L, Shore D. 1994. Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes & Development* 8:2257-2269.

Morillon A, Karabetsov N, Nair A, Mellor J. 2005a. Dynamic Lysine Methylation on Histone H3 Defines the Regulatory Phase of Gene Transcription. *Molecular Cell* 18:723-734.

Müller T, Gilson E, Schmidt R, Giraldo R, Sogo J, Gross H, Gasser SM. 1994. Imaging the asymmetrical DNA bend induced by repressor activator protein 1 with scanning tunneling microscopy. *J. Struct. Biol.* 113:1-12.

Murton BL, Chin WL, Ponting CP, Itzhaki LS. 2010. Characterising the Binding Specificities of the Subunits Associated with the KMT2/Set1 Histone Lysine Methyltransferase. *Journal of Molecular Biology* 398:481-488.

Nagy PL, Griesenbeck J, Kornberg RD, Cleary ML. 2002a. A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:90-94.

Nagy PL, Griesenbeck J, Kornberg RD, Cleary ML. 2002b. A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:90-94.

Nakada D, Matsumoto K, Sugimoto K. 2003. ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes & Development* 17:1957-1962.

Nathan D, Sterner DE, Berger SL. 2003. Histone modifications: Now summoning sumoylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:13118-13120.

Ng HH, Robert F, Young RA, Struhl K. 2003. Targeted Recruitment of Set1 Histone Methylase by Elongating Pol II Provides a Localized Mark and Memory of Recent Transcriptional Activity. *Molecular Cell* 11:709-719.

Ng HH, Xu R-M, Zhang Y, Struhl K. 2002. Ubiquitination of Histone H2B by Rad6 Is Required for Efficient Dot1-mediated Methylation of Histone H3 Lysine 79. *Journal of Biological Chemistry* 277:34655-34657.

Nielsen PR, Nietlispach D, Mott HR, Callaghan J, Bannister A, Kouzarides T, Murzin AG, Murzina NV, Laue ED. 2002. Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature* 416:103-107.

Nislow C, Ray E, Pillus L. 1997a. SET1, A Yeast Member of the Trithorax Family, Functions in Transcriptional Silencing and Diverse Cellular Processes. *Mol Biol Cell* 8:2421-2436.

Nugent CI, Hughes TR, Lue NF, Lundblad V. 1996. Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* 274:249-252.

O'Sullivan RJ, Karlseder J. 2010. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Available from: <http://www.nature.com.gate1.inist.fr/doi/10.1038/nrm2848>

- Opresko PL, Mason PA, Podell ER, Lei M, Hickson ID, Cech TR, Bohr VA. 2005. POT1 stimulates RecQ helicases WRN and BLM to unwind telomeric DNA substrates. *J. Biol. Chem.* 280:32069-32080.
- Opresko PL, Sowd G, Wang H. 2009. The Werner syndrome helicase/exonuclease processes mobile D-loops through branch migration and degradation. *PLoS ONE* 4:e4825.
- Osley MA. 2004. H2B ubiquitylation: the end is in sight. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1677:74-78.
- Osterhage JL, Talley JM, Friedman KL. 2006. Proteasome-dependent degradation of Est1p regulates the cell cycle-restricted assembly of telomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:720-728.
- Oza P, Jaspersen SL, Miele A, Dekker J, Peterson CL. 2009a. Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery. *Genes & Development* 23:912 -927.
- Paeschke K, Capra JA, Zakian VA. 2011. DNA replication through G-quadruplex motifs is promoted by the *Saccharomyces cerevisiae* Pif1 DNA helicase. *Cell* 145:678-691.
- Palladino F, Laroche T, Gilson E, Axelrod A, Pillus L, Gasser SM. 1993. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* 75:543-555.
- Palm W, de Lange T. 2008. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.* 42:301-334.
- Pardo B, Marcand S. 2005. Rap1 prevents telomere fusions by nonhomologous end joining. *EMBO J* 24:3117-3127.
- Paro R, Hogness DS. 1991. The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:263-267.
- Pennock E, Buckley K, Lundblad V. 2001. Cdc13 Delivers Separate Complexes to the Telomere for End Protection and Replication. *Cell* 104:387-396.
- Pike JE, Burgers PMJ, Campbell JL, Bambara RA. 2009. Pif1 Helicase Lengthens Some Okazaki Fragment Flaps Necessitating Dna2 Nuclease/Helicase Action in the Two-nuclease Processing Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 284:25170 -25180.
- Pitt CW, Cooper JP. 2010. Pot1 inactivation leads to rampant telomere resection and loss in one cell cycle. *Nucleic Acids Res.* 38:6968-6975.
- Prescott J, Blackburn EH. 1997. Telomerase RNA mutations in *Saccharomyces cerevisiae* alter telomerase action and reveal nonprocessivity in vivo and in vitro. *Genes & Development* 11:528 -540.
- Puglisi A, Bianchi A, Lemmens L, Damay P, Shore D. 2008. Distinct roles for yeast Stn1 in telomere capping and telomerase inhibition. *EMBO J.* 27:2328-2339.
- Qi H, Zakian VA. 2000. The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase α and the telomerase-associated Est1 protein.

Genes & Development 14:1777 -1788.

Randall H. M. 2000. RAP, RAP, open up! New wrinkles for RAP1 in yeast. Trends in Genetics 16:51-53.

Rawal P, Kummarasetti VBR, Ravindran J, Kumar N, Halder K, Sharma R, Mukerji M, Das SK, Chowdhury S. 2006. Genome-wide prediction of G4 DNA as regulatory motifs: Role in Escherichia coli global regulation. Genome Research 16:644 -655.

Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun Z-W, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, et al. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. Nature 406:593-599.

Ribeyre C, Lopes J, Boulé J-B, Piazza A, Guédin A, Zakian VA, Mergny J-L, Nicolas A. 2009. The Yeast Pif1 Helicase Prevents Genomic Instability Caused by G-Quadruplex-Forming CEB1 Sequences In Vivo. PLoS Genet 5.

Rine J, Herskowitz I. 1987. Four Genes Responsible for a Position Effect on Expression From HML and HMR in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 116:9 -22.

Ritchie KB, Mallory JC, Petes TD. 1999. Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 19:6065-6075.

Ritchie KB, Petes TD. 2000a. The Mre11p/Rad50p/Xrs2p Complex and the Tel1p Function in a Single Pathway for Telomere Maintenance in Yeast. Genetics 155:475 -479.

Robzyk K, Recht J, Osley MA. 2000. Rad6-Dependent Ubiquitination of Histone H2B in Yeast. Science 287:501 -504.

Roguev A, Schaft D, Shevchenko A, Pijnappel WW, Wilm M, Aasland R, Stewart AF. 2001. The Saccharomyces cerevisiae Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. EMBO J. 20:7137-7148.

Roguev A, Shevchenko Anna, Schaft D, Thomas H, Stewart AF, Shevchenko Andrej. 2004. A comparative analysis of an orthologous proteomic environment in the yeasts Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe. Mol. Cell Proteomics 3:125-132.

Rosaleny LE, Ruiz-García AB, García-Martínez J, Pérez-Ortín JE, Tordera V. 2007. The Sas3p and Gcn5p histone acetyltransferases are recruited to similar genes. Genome Biol 8:R119-R119.

Rossi ML, Pike JE, Wang W, Burgers PMJ, Campbell JL, Bambara RA. 2008. Pif1 Helicase Directs Eukaryotic Okazaki Fragments toward the Two-nuclease Cleavage Pathway for Primer Removal. Journal of Biological Chemistry 283:27483 -27493.

Rossi ML, Purohit V, Brandt PD, Bambara RA. 2006. Lagging Strand Replication Proteins in Genome Stability and DNA Repair. Chemical Reviews 106:453-473.

Roy R, Meier B, McAinsh AD, Feldmann HM, Jackson SP. 2004. Separation-of-function mutants of yeast Ku80 reveal a Yku80p-Sir4p interaction involved in telomeric silencing. J.

Biol. Chem. 279:86-94.

Rundlett SE, Carmen AA, Kobayashi R, Bavykin S, Turner BM, Grunstein M. 1996. 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.

Sabourin M, Tuzon CT, Zakian VA. 2007. Telomerase and Tel1p Preferentially Associate with Short Telomeres in *S. cerevisiae*. *Molecular Cell* 27:550-561.

Sandell LL, Zakian VA. 1993. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* 75:729-739.

Santos-Rosa H, Bannister AJ, Dehe PM, Géli V, Kouzarides T. 2004. Methylation of H3 lysine 4 at euchromatin promotes Sir3p association with heterochromatin. *J. Biol. Chem.* 279:47506-47512.

Santos-Rosa H, Schneider R, Bernstein BE, Karabetsou N, Morillon A, Weise C, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. 2003. Methylation of Histone H3 K4 Mediates Association of the Isw1p ATPase with Chromatin. *Molecular Cell* 12:1325-1332.

Schneider J, Wood A, Lee J-S, Schuster R, Dueker J, Maguire C, Swanson SK, Florens L, Washburn MP, Shilatifard A. 2005. Molecular Regulation of Histone H3 Trimethylation by COMPASS and the Regulation of Gene Expression. *Molecular Cell* 19:849-856.

Schoeftner S, Blasco MA. 2008. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* 10:228-236.

Schramke V, Neecke H, Brevet V, Corda Y, Lucchini G, Longhese MP, Gilson E, Géli V. 2001. The *set1Δ* mutation unveils a novel signaling pathway relayed by the Rad53-dependent hyperphosphorylation of replication protein A that leads to transcriptional activation of repair genes. *Genes Dev* 15:1845-1858.

Schulz VP, Zakian VA. 1994. The *Saccharomyces cerevisiae* PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. *Cell* 76:145-155.

Seto AG, Zaug AJ, Sobel SG, Wolin SL, Cech TR. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* 401:177-180.

Shi X, Kachirskaia I, Walter KL, Kuo J-HA, Lake A, Davrazou F, Chan SM, Martin DGE, Fingerman IM, Briggs SD, et al. 2007. Proteome-wide Analysis in *Saccharomyces cerevisiae* Identifies Several PHD Fingers as Novel Direct and Selective Binding Modules of Histone H3 Methylated at Either Lysine 4 or Lysine 36. *J Biol Chem* 282:2450-2455.

Shia W-J, Osada S, Florens L, Swanson SK, Washburn MP, Workman JL. 2005. Characterization of the Yeast Trimeric-SAS Acetyltransferase Complex. *Journal of Biological Chemistry* 280:11987 -11994.

Shippen-Lentz D, Blackburn EH. 1990. Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 247:546-552.

Shore D, Nasmyth K. 1987. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* 51:721-732.

- Singer MS, Kahana A, Wolf AJ, Meisinger LL, Peterson SE, Goggin C, Mahowald M, Gottschling DE. 1998. Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150:613-632.
- Smith ER, Eisen A, Gu W, Sattah M, Pannuti A, Zhou J, Cook RG, Lucchesi JC, Allis CD. 1998. ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3561-3565.
- Smith J, Rothstein R. 1995. A mutation in the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* single-stranded DNA-binding protein Rfa1 stimulates a RAD52-independent pathway for direct-repeat recombination. *Mol Cell Biol* 15:1632-1641.
- Smith JS, Boeke JD. 1997. An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes & Development* 11:241 -254.
- Smith S, de Lange T. 1997. TRF1, a mammalian telomeric protein. *Trends Genet.* 13:21-26.
- Sollier J, Lin W, Soustelle C, Suhre K, Nicolas A, Géli V, de La Roche Saint-André C. 2004. Set1 is required for meiotic S-phase onset, double-strand break formation and middle gene expression. *EMBO J* 23:1957-1967.
- South PF, Fingerman IM, Mersman DP, Du H-N, Briggs SD. 2010. A Conserved Interaction between the SDI Domain of Bre2 and the Dpy-30 Domain of Sdc1 Is Required for Histone Methylation and Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry* 285:595 -607.
- Stansel RM, de Lange T, Griffith JD. 2001. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J.* 20:5532-5540.
- Stellwagen AE, Haimberger ZW, Veatch JR, Gottschling DE. 2003. Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes & Development* 17:2384 -2395.
- Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41-45.
- Sun Z-W, Allis CD. 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418:104-108.
- Talley JM, DeZwaan DC, Maness LD, Freeman BC, Friedman KL. 2011. Stimulation of Yeast Telomerase Activity by the Ever Shorter Telomere 3 (Est3) Subunit Is Dependent on Direct Interaction with the Catalytic Protein Est2. *Journal of Biological Chemistry* 286:26431 -26439.
- Tang J, Gary JD, Clarke S, Herschman HR. 1998. PRMT 3, a Type I Protein Arginine N-Methyltransferase That Differs from PRMT1 in Its Oligomerization, Subcellular Localization, Substrate Specificity, and Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 273:16935 -16945.
- Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272:408-411.
- Teixeira MT, Arneric M, Sperisen P, Lingner J. 2004a. Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states. *Cell*

117:323-335.

Teixeira MT, Gilson E. 2005. Telomere maintenance, function and evolution: the yeast paradigm. *Chromosome Res* 13:535-548.

Teng S-C, Chang J, McCowan B, Zakian VA. 2000. Telomerase-Independent Lengthening of Yeast Telomeres Occurs by an Abrupt Rad50p-Dependent, Rif-Inhibited Recombinational Process. *Molecular Cell* 6:947-952.

Tomita K, Kibe T, Kang H-Y, Seo Y-S, Uritani M, Ushimaru T, Ueno M. 2004. Fission Yeast Dna2 Is Required for Generation of the Telomeric Single-Strand Overhang. *Mol Cell Biol* 24:9557-9567.

Tse C, Georgieva EI, Ruiz-García AB, Sendra R, Hansen JC. 1998. Gcn5p, a Transcription-related Histone Acetyltransferase, Acetylates Nucleosomes and Folded Nucleosomal Arrays in the Absence of Other Protein Subunits. *Journal of Biological Chemistry* 273:32388 -32392.

Tseng S-F, Lin J-J, Teng S-C. 2006. The telomerase-recruitment domain of the telomere binding protein Cdc13 is regulated by Mec1p/Tel1p-dependent phosphorylation. *Nucleic Acids Res* 34:6327-6336.

Tuzon CT, Wu Y, Chan A, Zakian VA. 2011. The *Saccharomyces cerevisiae* Telomerase Subunit Est3 Binds Telomeres in a Cell Cycle- and Est1-Dependent Manner and Interacts Directly with Est1 In Vitro. *PLoS Genet* 7.

Uemura H, Watanabe-Yoshida M, Ishii N, Shinzato T, Haw R, Aoki Y. 2004. Isolation and characterization of *Candida albicans* homologue of RAP1, a repressor and activator protein gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21:1-10.

Vega LR, Phillips JA, Thornton BR, Benanti JA, Onigbanjo MT, Toczyski DP, Zakian VA. 2007. Sensitivity of Yeast Strains with Long G-Tails to Levels of Telomere-Bound Telomerase. *PLoS Genet* 3.

Venkatasubrahmanyam S, Hwang WW, Meneghini MD, Tong AHY, Madhani HD. 2007. Genome-wide, as opposed to local, antisilencing is mediated redundantly by the euchromatic factors Set1 and H2A.Z. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16609-16614.

Verdone L, Caserta M, Di Mauro E. 2005. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem. Cell Biol* 83:344-353.

Viscardi V, Bonetti D, Cartagena-Lirola H, Lucchini G, Longhese MP. 2007. MRX-dependent DNA damage response to short telomeres. *Mol. Biol. Cell* 18:3047-3058.

Vitaliano-Prunier A, Menant A, Hobeika M, Geli V, Gwizdek C, Dargemont C. 2008. Ubiquitylation of the COMPASS component Swd2 links H2B ubiquitylation to H3K4 trimethylation. *Nat Cell Biol* 10:1365-1371.

Vodenicharov MD, Wellinger RJ. 2006. DNA Degradation at Unprotected Telomeres in Yeast Is Regulated by the CDK1 (Cdc28/C1b) Cell-Cycle Kinase. *Molecular Cell* 24:127-137.

Wade PA. 2001. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Human Molecular Genetics* 10:693 -

698.

Waga S, Stillman B. 1998. THE DNA REPLICATION FORK IN EUKARYOTIC CELLS. *Annu. Rev. Biochem.* 67:721-751.

Wagner M, Price G, Rothstein R. 2006. The Absence of Top3 Reveals an Interaction Between the Sgs1 and Pif1 DNA Helicases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 174:555 -573.

Walter W, Clynes D, Tang Y, Marmorstein R, Mellor J, Berger SL. 2008. 14-3-3 interaction with histone H3 involves a dual modification pattern of phosphoacetylation. *Mol. Cell. Biol* 28:2840-2849.

Wang H, Huang Z-Q, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P, et al. 2001. Methylation of Histone H4 at Arginine 3 Facilitating Transcriptional Activation by Nuclear Hormone Receptor. *Science* 293:853 -857.

Wellinger RJ, Sen D. 1997. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *European Journal of Cancer* 33:735-749.

Wellinger RJ, Wolf AJ, Zakian VA. 1993. *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* 72:51-60.

Winkler GS, Kristjuhan A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ. 2002. Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3517-3522.

Wood A, Schneider J, Dover J, Johnston M, Shilatifard A. 2003. The Paf1 Complex Is Essential for Histone Monoubiquitination by the Rad6-Bre1 Complex, Which Signals for Histone Methylation by COMPASS and Dot1p. *Journal of Biological Chemistry* 278:34739 - 34742.

Wotton D, Shore D. 1997. A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* 11:748 -760.

Wright JH, Gottschling DE, Zakian VA. 1992. *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev.* 6:197-210.

Wu Y, Shin-ya K, Brosh RM. 2008. FANCD1 Helicase Defective in Fanconi Anemia and Breast Cancer Unwinds G-Quadruplex DNA To Defend Genomic Stability. *Mol. Cell. Biol.* 28:4116-4128.

Wysocki R, Javaheri A, Allard S, Sha F, Côté J, Kron SJ. 2005. Role of Dot1-Dependent Histone H3 Methylation in G1 and S Phase DNA Damage Checkpoint Functions of Rad9. *Mol Cell Biol* 25:8430-8443.

Xhemalce B, Miller KM, Driscoll R, Masumoto H, Jackson SP, Kouzarides T, Verreault A, Arcangioli B. 2007. Regulation of histone H3 lysine 56 acetylation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 282:15040-15047.

Yoshida M, Furumai R, Nishiyama M, Komatsu Y, Nishino N, Horinouchi S. 2001. Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol* 48 Suppl 1:S20-26.

Yu MC, Lamming DW, Eskin JA, Sinclair DA, Silver PA. 2006. The role of protein arginine methylation in the formation of silent chromatin. *Genes Dev* 20:3249-3254.

Zakian VA. 1995. Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 270:1601-1607.

Zappulla DC, Cech TR. 2004. Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:10024-10029.

Zaug AJ, Podell ER, Cech TR. 2005. Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:10864-10869.

Zhang K, Lin W, Latham JA, Riefler GM, Schumacher JM, Chan C, Tatchell K, Hawke DH, Kobayashi R, Dent SYR. 2005. The Set1 methyltransferase opposes Ipl1 aurora kinase functions in chromosome segregation. *Cell* 122:723-734.

Zhang W, Durocher D. 2010a. De novo telomere formation is suppressed by the Mec1-dependent inhibition of Cdc13 accumulation at DNA breaks. *Genes Dev.* 24:502-515.

Zhao X, Muller EG, Rothstein R. 1998. A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol. Cell* 2:329-340.

Zhou J-Q, Monson EK, Teng S-C, Schulz VP, Zakian VA. 2000. Pif1p Helicase, a Catalytic Inhibitor of Telomerase in Yeast. *Science* 289:771 -774.

Annexes

Distinct roles for H3K4 methylation marks in repression of coding genes through mechanisms coupled to 3'-end antisense transcription

Thanasis Margaritis¹, Vincent Oreal², Nathalie Brabers¹, Laetitia Maestroni², Adeline Vitaliano-Prunier³, Joris J. Benschop¹, Sander van Hooff¹, Dik van Leenen¹, Catherine Dargemont^{3,4}, Vincent Géli^{2,4}, Frank C.P. Holstege^{1,4}

¹Department of Physiological Chemistry, University Medical Center Utrecht, PO Box 85060, 3508 AB Utrecht, the Netherlands

²CNRS, Unité Propre de Recherche 3081, Genome Instability and Carcinogenesis Conventionné par l'Université d'Aix-Marseille 2, 13402 Marseille Cedex 20, France

³Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot, CNRS, 15 rue Hélène Brion 75205 Paris Cedex 13, France

⁴equal contribution/corresponding authors

Running head: H3K4 methylation and repression

Keywords: transcription regulation, histone modification, methylation, antisense RNA, silencing

Abstract

Histone H3 can be mono-, di- or trimethylated on lysine 4 but the influence of these marks on transcription is poorly understood. We analyze the roles of different H3K4 methylation marks in *Saccharomyces cerevisiae* by determining genome-wide mRNA expression-profiles of mutants in the Set1 complex COMPASS. Trimethylation loss on its own has virtually no effect on steady-state or dynamically changing mRNA expression levels. Combined loss of H3K4me3 and H3K4me2 results in steady-state upregulation and delays in the repression kinetics of small groups of genes. COMPASS-repressed genes have distinct H3K4 methylation patterns, with enrichment of H3K4me3 at their 3'-end, indicating that Set1-mediated repression is coupled to 3'-end antisense transcription. For a small group of Set1-repressed genes including PHO84, repression is increased upon deletion of the exosome component RRP6. However, our genome-wide analyses indicate that for the majority of Set1-repressed genes, the process of antisense transcription rather than antisense transcripts is important for repression. The analyses indicate that H3K4me3 at the 3'-end is required to maintain antisense transcription and that H3K4me2 deposition plays an independent repressive role. Derepression is mimicked by global histone reduction. The non-redundant role of COMPASS is likely specific repression through chromatin modification that is 3'-end antisense transcription dependent.

Introduction

Packaging of eukaryotic DNA with histones has a repressive effect on transcription (Kornberg and Lorch 1999). Histones are subject to a variety of post-translational modifications, such as acetylation, methylation, phosphorylation and ubiquitinylation. These modifications correlate with specific states of transcription, as well as with other DNA-linked processes, such as chromosome segregation and DNA repair (Jenuwein and Allis 2001; Li et al. 2007). Among the epigenetic marks, histone methylation has been extensively associated with both activation and repression of genes in euchromatic and heterochromatic regions respectively (Lachner and Jenuwein 2002). Methylation of lysine 4 on histone H3 (H3K4) for example, has been linked to transcriptional activation in many eukaryotic species. Vertebrates possess several H3K4 methyltransferases related to the SET domain of yeast Set1 and *Drosophila* Trx (MLL family) (Ruthenburg et al. 2007). These methyltransferases are responsible for mono- (H3K4me1), di- (H3K4me2) and trimethylation (H3K4me3) of H3K4 (Santos-Rosa et al. 2002). Di- and trimethylation of H3K4 is generally restricted to euchromatin and genome-wide studies in metazoan cells reveal that high levels of histone acetylation and H3K4 methylation are detected in promoter regions of active genes (Schneider et al. 2004; Bernstein et al. 2005; Kim et al. 2005; Roh et al. 2006; Barski et al. 2007). H3K4me2 and H3K4me3 are thought to facilitate transcription through the recruitment of nucleosome remodelling complexes and histone modifying enzymes, or by preventing repressors from binding to chromatin (Berger 2007). Different factors containing conserved domains such as the chromodomain, WD40-repeat, and the PhD domain have been shown to recognize H3K4 methylation and have been proposed to elicit the functional effects (Flanagan et al. 2005; Pray-Grant et al. 2005; Wysocka et al. 2005; Couture et al. 2006; Li et al. 2006; Martin et al. 2006; Shi et al. 2006; Steward et al. 2006; Wysocka et al. 2006; Sims et al. 2007; Vermeulen et al. 2007). The nature and mechanism through which various H3K4 methylation states contribute to control of gene expression is as yet not fully understood.

In *Saccharomyces cerevisiae*, H3K4 methylation is carried out by Set1C/COMPASS (Dehe and Geli 2006), a protein complex composed of Set1 as the catalytic subunit and seven other components (Swd1, Swd2, Swd3, Bre2, Sdc1, Spp1 and Shg1) (Briggs et al. 2001; Miller et al. 2001; Roguev et al. 2001; Nagy et al. 2002). Inactivation of the individual subunits differentially affects the methylation state of H3K4. Swd1, Swd2 and Swd3 are required for Set1/COMPASS stability and their disruption affects H3 binding and all three H3K4

methylation states. Bre2 and Sdc1 promote the efficient di- and trimethylation of H3K4, while inactivation of Spp1 only affects H3K4 trimethylation (Morillon et al. 2005; Schneider et al. 2005; Dehe et al. 2006). In addition, monoubiquitylation of Swd2 has recently been shown to mediate the trans-tail process between H2B ubiquitylation of H3K4 trimethylation, by controlling the recruitment of the Spp1 subunit (Vitaliano-Prunier et al. 2008). Set1 has been found to be predominantly associated with the coding regions of highly transcribed RNA polymerase II genes and the presence of trimethylated H3K4 generally correlates with Set1 occupancy (Ng et al. 2003). Genome-wide studies in yeast indicate that active transcription is characteristically accompanied by histone H3K4 trimethylation at the 5'-end of genes and by H3K4 dimethylation and monomethylation at nucleosomes positioned further downstream in the transcription unit (Pokholok et al. 2005). H3K4 trimethylation has been linked to transcription initiation and elongation (Santos-Rosa et al. 2002; Sollier et al. 2004; Morillon et al. 2005; Taverna et al. 2006), however its precise role in transcription as well as the role of H3K4 mono- and dimethylation remains poorly understood. One of the prevalent ideas for a general role of H3K4 methylation in *S. cerevisiae* is that transcription-associated H3 methylation, as well as deposition of the histone variant H2A.Z, antagonizes the local spread of Sir-dependent silent chromatin into adjacent euchromatic regions (Meneghini et al. 2003; Santos-Rosa et al. 2004; Zhang et al. 2005). It has been recently proposed that H2A.Z deposition and Set1 cooperate to prevent Sir-dependent repression of a large number of genes located across the genome (Venkatasubrahmanyam et al. 2007). The redundant role of H3K4 methylation and H2AZ deposition may thus buffer gene transcription from changes in the euchromatic regions.

Recently, a form of RNA-mediated transcriptional gene silencing within euchromatin has been reported in *S. cerevisiae*, in spite of the absence of the RNAi machinery in budding yeast. Ty1 expression and mobility, PHO84 and GAL1/10 expression have been shown to be regulated by antisense RNA (Camblong et al. 2007; Berretta et al. 2008; Houseley et al. 2008). For PHO84, it was found in addition that highly expressed PHO84 antisense RNAs from an ectopic PHO84 gene copy were able to trigger transcriptional silencing of the endogenous PHO84 gene (Camblong et al., 2009). In contrast to the cis-mediated antisense-silencing, the Hda1/2/3 complex is not required for the trans-silencing induced by PHO84 antisense RNAs whose production was found positively regulated by Set1 (Camblong et al., 2009). More generally, genome-wide analysis has recently revealed the existence of hundreds

of previously uncharacterized non-coding RNAs (ncRNAs) that either stably exist or are rapidly degraded by the RNA surveillance pathway (Neil et al. 2009; Xu et al. 2009). Strikingly, most of these newly identified transcripts initiate from nucleosome-free regions associated with the promoters of other transcripts or at the 3'-ends of protein-coding genes (Xu et al. 2009). Regulation of ncRNAs is far from understood. Although genome-wide analysis of H3K4 trimethylation shows preferential enrichment at core promoter regions on average (Pokholok et al. 2005; Kirmizis et al. 2007), detailed examination of such data shows that H3K4 trimethylation is not exclusively promoter-associated. H3K4me3 can also be found within ORFs and at the 3'-ends of a number of genes, perhaps marking the 5'-ends of ncRNAs. These observations suggest that Set1-dependent H3K4 methylation may not only be involved in the control of coding gene expression but also in transcription of ncRNAs.

Here we present an extensive genome-wide analysis that discriminates between the roles of the various H3K4 methylation states. While preventing H3K4 trimethylation on its own has no effect on mRNA expression of coding genes, 1% of coding genes are up-regulated upon combined loss of di- and trimethylation. Further analyses indicate distinct roles for these marks in repression of coding genes through mechanisms coupled to 3'-end antisense transcription by Set1.

Results

Loss of H3K4 dimethylation correlates with increased expression of a subset of genes

Previous genome-wide analyses of the effects of H3K4 methylation have yielded conflicting results (Bernstein et al. 2002; Santos-Rosa et al. 2002; Boa et al. 2003; Venkatasubrahmanyam et al. 2007). While two studies suggested a global reduction in transcription when H3K4 methylation is abolished (Bernstein et al. 2002; Boa et al. 2003), a third study reported and focused on only 480 marginally down-regulated genes, even though twice as many genes were observed to be up-regulated by applying the same selection criteria (Santos-Rosa et al. 2002). A more recent and statistically stringent study showed that 200 genes become up-regulated upon loss of SET1, with virtually no down-regulation observed (Venkatasubrahmanyam et al. 2007), suggesting that H3K4 methylation may actually play a more prominent role in repression than in activation of protein-coding genes. These previous studies focused on loss of all three H3K4 methylation states simultaneously, either through

deletion of SET1 or through substitution of H3K4 with alanine (Venkatasubrahmanyam et al. 2007).

To investigate whether there are separate roles for H3K4 mono-, di- and trimethylation in transcription, we made use of the fact that mutating different components of COMPASS results in different methylation states. We first checked the methylation status of H3K4 in strains with deletions of the non-essential members of the complex, in the single genetic background used for this study (BY4741). In addition, we analyzed a strain carrying a mutation that prevents monoubiquitylation of the essential subunit Swd2 (Swd2K68,69R) and results in a severe reduction of H3K4me3 (Vitaliano-Prunier et al. 2008). Histones were purified from each strain and their H3K4 methylation status was checked with antibodies specific for each methylated state (Fig. 1A). As expected from previous results (see the introduction), deletion of SET1, SWD1 or SWD3 abolishes mono-, di- and trimethylation of H3K4. Deletion of BRE2 or SDC1 results in a complete loss of H3K4me3, a significant decrease of H3K4me2 but no change in H3K4me1, while inactivation of SPP1 or mutating SWD2 (swd2K68,69R) results in a severe decrease of H3K4me3 only (Fig. 1A).

The same strains were analyzed in parallel by DNA microarray expression-profiling. Besides replication of experiments from independent cultures (Materials and Methods), controls were included that allow detection of global changes in the entire mRNA population (van de Peppel et al. 2003). Such global changes were not detected. In agreement with the most recent study of SET1 deletion on its own (Venkatasubrahmanyam et al. 2007), expression of only a few genes is effected in any of the different mutants of COMPASS. Within the entire set of deletion mutants, 69 genes changed significantly in at least two mutants (p-value lower than 0.01 and fold-change versus wild-type more than 1.7), with many more genes showing increased expression compared to a decrease (Fig. 1B). Deletion of any of the five subunits Set1, Swd1, Swd3, Bre2 and Sdc1 leads essentially to the same expression profile. It is interesting to correlate the changes in gene expression to the different H3K4 methylation states observed in the different mutants. Virtually no significant changes in gene expression are observed in spp1. or in the swd2K68,69R mutant (Fig. 1B) that both show a severe decrease of H3K4 trimethylation (Fig. 1A). Changes in gene expression are observed in bre2. and sdc1., where H3K4 dimethylation is significantly diminished on top of the loss of trimethylation, (Fig. 1A, B). The additional loss of H3K4 monomethylation, as observed in

set1., swd1. or swd3. (Fig. 1A), does not lead to significant additional changes in gene expression (Fig. 1B). To distinguish whether the repressive effect of COMPASS is related to H3K4 methylation or rather is due to an unidentified methylation target of Set1, a H3K4 point mutant was analyzed. Once again, the predominant effect is up-regulation (Fig. 1C) and the overlap with the COMPASS-repressed genes is extremely significant (pvalue $3.1 \cdot 10^{-27}$). This confirms that the repressive effect of COMPASS is through H3K4 methylation.

It has been clearly shown that H3K4 di- and tri-, but not monomethylation states are controlled by the Rad6/Bre1-mediated monoubiquitylation of histone H2BK123 via a trans-tail pathway involving ubiquitylation of Swd2 (Dover et al. 2002; Sun and Allis 2002; Dehe et al. 2005; Lee et al. 2007; Vitaliano-Prunier et al. 2008). Profiling a bre1. strain led to an extremely strong overlap with the COMPASS-repressed genes with a p-value of $1.0 \cdot 10^{-37}$ (Fig. 1C). The repressive effects observed here therefore correspond to the action of the entire pathway from ubiquitylation of H2B to H3K4me_{2/3}. Furthermore, the results demonstrate that loss of any of the methylation states of H3K4 does not globally impact transcription when assayed under steady state conditions. The most notable effect is increased expression of a set of genes upon combined loss of both di- and trimethylation, with the dimethylation apparently having a stronger role.

Repression dynamics are subtly affected by loss of H3K4 methylation

We next asked whether the absence of H3K4 methylation would effect the kinetics of gene expression changes. This is based on the proposal that H3K4me₃ may have a memory function, marking genes that require rapid upregulation under specific growth conditions (Ng et al. 2003). Conditions were chosen during which expression of a large number of genes change. For this purpose, wild-type (wt), set1. (absence of all three H3K4 methylation states) and spp1. (lack of H3K4 trimethylation only) were expression-profiled at multiple time-points during the transition from low to high glucose. During this transition, expression of approximately 3400 genes change significantly in wt cells, with a large variety of different dynamics (Fig. 2A). No major differences in the transcription kinetics between wt and the two mutant strains can be observed. This indicates that disruption of H3K4 methylation or H3K4 trimethylation on its own does not have a global effect on the dynamics of transcription (Fig. 2A), similarly to the lack of a global effect observed under steady-state conditions (Fig. 1B).

A detailed search for genes showing slight differences in their induction or repression kinetics was then performed among the 3400 genes that change significantly during the time-course experiment. To facilitate visualization of subtle changes, the wt timecourse data was subtracted from the two mutant time-course datasets (Fig. 2B, righthand panels, spp1. vs wt and set1. vs wt). In the set1. strain (loss of all three H3K4 methylation states) 220 genes show differences in their expression kinetics compared to wt, with the vast majority of these exhibiting a repression defect observed as delayed repression or faster activation (Fig. 6B). For spp1. (loss of H3K4me3) only 15 genes were found that exhibit differences in their expression kinetics (Fig. 2B, fourth panel). In agreement with the steady-state analysis, effects found in the time-course experiments are thus virtually all attributable to the complete loss of methylation observed in set1., rather than to the specific loss of H3K4me3 observed in spp1.. The results also agree with a repressive role for COMPASS on mRNA expression of a subset of genes, as observed in the steady-state experiments too (Fig. 1).

Unconventional methylation patterns at the 3'-end of COMPASS-repressed genes

We next investigated whether there were any particular characteristics shared by the set of genes upregulated upon mutation of COMPASS components (Fig. 1B). In agreement with a recent analysis of set1. (Venkatasubrahmanyam et al. 2007), statistically significant enrichment for location close to telomeres is observed (Fig. S1). Among the 69 Set1-repressed genes, 10 are telomere-proximal (within 15 kb) and 26 are located within 45 kb from a telomere (Fig. 3). Although this enrichment is significant, in most cases the expression of adjacent genes was not found to be affected by the deletion of COMPASS subunits. For instance, PHO11, SNO4, MCH2, SOR2, YGL258W-A and PHO12, that are located between 4 and 10 kb from the telomeric DNA on different chromosomes (Supplemental Table 1) are all flanked by genes that are not affected by the absence of Set1. It is therefore unlikely that the set1.-dependent upregulation of telomere-proximal genes is caused by loss of the Sir-dependent telomeric position effect (Hecht et al. 1995; Nislow et al. 1997; Corda et al. 1999; Roguev et al. 2001; Krogan et al. 2002; Santos-Rosa et al. 2004).

Next we examined the H3K4 methylation patterns of COMPASS-repressed genes, using data from a wt strain from the same genetic background (Kirmizis et al. 2007). Intriguingly, the average methylation profiles (mono, di, and tri) of COMPASS-repressed genes deviates from the average of all genes since it is nearly completely flat (data not shown) and doesn't show

the distinct enrichment of H3K4me3 around the promoter region (Pokholok et al. 2005; Kirmizis et al. 2007). Examination of the profiles of individual genes indicated that the flat average H3K4 methylation profiles of COMPASS-repressed genes is caused by differences in the methylation peak locations between individual genes cancelling each other out when calculating an average, rather than by a general lack of any enrichment for H3K4 methylation across these genes. As the effect of COMPASS deletions is attributable to H3K4 methylation (Fig. 1), we selected for further analysis only those COMPASS-repressed genes that show a higher than two-fold enrichment for H3K4me2 or H3K4me3 anywhere across the gene and flanking regions (Kirmizis et al. 2007). The methylation patterns of these 47 genes deviate significantly from previously published average gene profiles (Pokholok et al. 2005; Kirmizis et al. 2007) (Fig. 3). Most striking is the presence of distinct peaks of trimethylation at the 3'-end of the coding region, rather than at the 5'-end as is observed in the average H3K4 methylation patterns of all genes.

Promotion of 3'-end antisense transcription by Set1 contributes to repression on coding genes

A plausible interpretation of the H3K4 di- and trimethylation peaks at the 3'-ends of COMPASS-repressed genes is the presence of antisense transcription initiation at the 3'-end of the coding region. This agrees with analysis of recently established maps of non-coding RNAs (Neil et al. 2009; Xu et al. 2009), revealing that antisense RNAs can indeed be detected for more than 85% of COMPASS-repressed genes (Supplemental Table 2). Interestingly, PHO84 belongs to the group of COMPASS-repressed genes identified here (Fig. 3B, marked with 2) and has recently been shown to be regulated by antisense RNA transcripts originating from its 3'-end (Camblong et al. 2007; Camblong et al. 2009). We therefore investigated the manner in which 3'-end antisense transcription is involved in all genes that exhibit Set1-mediated repression.

One hallmark of the mechanism recently uncovered for PHO84 repression is direct involvement of the antisense transcript. Either stabilization of the antisense transcript by deletion of the exosome component RRP6 (Camblong et al. 2007) or ectopic expression of the antisense transcript (Camblong et al. 2009) are both sufficient to repress sense transcription. To test whether COMPASS repression is mediated by 3'-end antisense transcript levels on all COMPASS-affected genes, an *rrp6*. profile was generated and compared to *set1*.. Deletion of

RRP6 does not have a general effect on all COMPASS-repressed genes (Fig. 4A). Nevertheless, in agreement with previous studies, a significant downregulation of PHO84 is observed (marked 2 in Fig. 4A). This suggests that for the majority of COMPASS-repressed genes, repression is not directly mediated by the presence of unstable antisense transcripts as is the case for PHO84 (Camblong et al. 2007).

Lack of downregulation on the majority of COMPASS-repressed genes in *rrp6*. may however simply be due to already low wt expression levels for most of these genes. Since these genes are upregulated in *set1.*, an *rrp6. set1.* double mutant was therefore analyzed (Fig. 4A). The double mutant expression-profile clearly reveals two classes of COMPASS-repressed genes, in agreement with the idea that the majority of Set1 repression is through a mechanism distinct from that observed on PHO84. On the smaller group, that includes PHO84 as well as several other phosphate-related genes (Fig. 4A), an epistatic effect is observed in *rrp6. set1.*, whereby the upregulation in *set1.* is lost in the double mutant. The largest group of Set1-repressed genes behaves in a different manner, still showing upregulation in the double mutant, similarly to their behaviour upon deletion of SET1 on its own.

Since the largest group of genes seems regulated by mechanisms that are not influenced by Rrp6-dependent stabilisation of antisense transcripts, the repressive effect of COMPASS on two representative genes from this group, AMS1 and YGR110W (indicated by 1 and 3 in Fig. 4A), were analyzed in more detail. Despite the lack of an effect in *rrp6.*, involvement of antisense transcription in Set1-dependent repression is nevertheless suggested by the matched location of H3K4 methylation patterns (Kirmizis et al. 2007) with antisense transcripts (Xu et al. 2009) (Fig. S2). The effects of different mutants on sense and antisense transcription were therefore analyzed by quantitative RT-PCR using strand-specific primers (Fig. 4B).

Sense transcript upregulation is observed in *set1.* (Fig. 4C), that exhibits loss of all H3K4 methylation (Fig. 1A), in *bre2.* (Fig. 4C), that exhibits loss of all H3K4me3 and most H3K4me2 (Fig. 1A) and in *set1.* combined with *rrp6.* (Fig. 4C), all in agreement with the microarray results (Fig. 1B, 4A). In *bre2.* and *set1.*, upregulation of sense transcription is accompanied by a decrease in antisense transcription (Fig. 4C). For these genes stabilisation of antisense transcripts does occur in *rrp6.* (Fig. 4C), but this does not result in more repression of sense transcription (Fig. 4C) as is clearly the case for PHO84 ((Camblong et al.

2007) and Fig. 4A). This confirms the presence of two classes of Set1-repressed genes (Fig 4A) and indicates that for the major group, repression of sense transcription is coupled to the process of antisense transcription itself rather than to an increase in antisense transcript levels through rrp6.-dependent stabilisation.

H3K4me3 promotes 3'-end antisense transcription and H3K4me2 contributes to coding gene repression

The analysis presented in Fig. 4C indicates that Set1 has a positive influence on antisense transcription. Strikingly, SPP1 deletion results in decreased antisense transcription, similar to SET1 deletion. This indicates that H3K4 trimethylation, which is found at the 3'-end of these genes (Fig S2) is required for 3'-end antisense transcription. In contrast to set1., spp1. does not show a concomitant derepression of sense transcription (Fig. 4C), also in agreement with the global microarray analyses (Fig. 1 and 2). Since spp1. still exhibits wt levels of H3K4me2 (Fig. 1) and no derepression of sense transcription (Fig. 4C), this indicates that the H3K4me2 mark is important for repression of sense transcription. It should be noted that antisense transcription level is significantly increased when RRP6 is deleted in combination with set1. (Fig 4C). This indicates that antisense transcription is promoted by but not fully dependent on H3K4me3. Together, the results of these experiments are consistent with a model, whereby the majority of COMPASS coding gene repression is dependent on the contribution of COMPASS towards 3'-antisense transcription. In this model H3K4me3 is required for maintenance of antisense transcription and deposition of H3K4me2 leads to repression of sense transcription.

COMPASS repression is mimicked by reducing nucleosome levels

We next asked what determines the specificity of the observed COMPASS effects. H3K4me2/3 marks many genes and around one third exhibit antisense transcripts (Xu et al. 2009) , yet only a subset are affected by deleting COMPASS subunits. It has recently been proposed that the transcription factor Reb1 may drive non-coding transcription either from neighbouring genes (Houseley et al. 2008) or from the promoter of the antisense transcript itself (Pinskaya et al. 2009). Reb1 binding sites are found downstream of only three COMPASS-repressed genes and no significant enrichment for Reb1 binding sites is found in the ORFs or flanking regions of genes up-regulated upon SET1 deletion, suggesting that the specificity of Set1 repressive effects is not generally linked to Reb1. In addition, no other

putative regulatory motifs could be detected in these regions using a combination of different algorithms (Wijaya et al. 2008).

An alternative explanation for the specific repressive effects of COMPASS is that this is dictated by sensitivity of specific genes to a particular chromatin structure. While profiling strains with altered histone expression levels we noted an interesting correlation with the collection of COMPASS mutants. To investigate this, a strain bearing single copies of the histone H3 and H4 genes under control of their native promoters (Dai et al. 2008) was analyzed. The strain exhibits slightly decreased H3 and H4 protein levels (Figure 5A). This results in upregulation of a specific subset of genes that strongly correspond to the same set of genes upregulated upon SET1 deletion (p-value 1.4×10^{-23} , Fig. 5B). Since SET1 deletion does not globally effect nucleosome levels (data not shown), the overlap between the set1. and histone reduction expression-profiles indicates that COMPASS effects genes that are inherently more sensitive to nucleosome density.

Discussion

Repressive role of COMPASS

The results presented here add to a number of reports that indicate that the major non-redundant role of COMPASS in *S. cerevisiae* is repression of coding genes (Camblong et al. 2009; Pinskaya et al. 2009). Early genome-wide analyses of set1. yielded conflicting results (Bernstein et al. 2002; Santos-Rosa et al. 2002; Boa et al. 2003). The analyses presented here, with replicate experiments for a variety of different COMPASS mutants under both steady-state and dynamic conditions, indicates that removal of H3K4me₃, the major mark of active transcription in eukaryotes, has no global effect. The repressive effects observed on a subset of genes are also in agreement with the most recent other genome-wide analysis of set1. (Venkatasubrahmanyam et al. 2007). Gene ontology analysis of these genes reveals an overrepresentation of vitamin metabolism (essentially thiamin biosynthesis) and spore wall assembly (Supplemental Table 3) in agreement with the cell wall and stationary phase defects previously observed in set1. cells (Nislow et al. 1997).

COMPASS and antisense transcription

What is the mechanism of the observed repression? Despite the fact that COMPASS-repressed genes show a significant enrichment for telomeric-proximal location (Fig. S1 and (Venkatasubrahmanyam et al. 2007)), Set1-dependent repression of these genes due to a telomere position effect can be ruled out since the derepression observed in *set1*. only affects individual genes within these regions. Analysis of methylation patterns (Fig. 3 and (Kirmizis et al. 2007)), non-coding RNA maps (Supplemental Table 2 and (Neil et al. 2009; Xu et al. 2009)) and the comparison of mutants with different methylation states support a model whereby COMPASS mediates repression of coding genes by maintaining the expression of 3'-end antisense transcripts through deposition of H3K4Me3 at the 3'-end.

An involvement of Set1 in promotion of 3'-end antisense transcription, resulting in a repressive effect on sense transcription has recently been reported for PHO84 that is repressed directly through the presence of antisense transcripts (Camblong et al. 2009). Our results are consistent with a repressive role for Set1 on PHO84. The genome-wide nature of these experiments indicate however that the majority of Set1 effected genes are repressed through a different mechanism that is antisense RNA independent and is caused by the process of antisense transcription itself. This mechanism is therefore more related to the recently reported attenuation in GAL10- GAL1 activation which is also facilitated through cryptic transcription (Pinskaya et al. 2009). One major difference is that for the mechanism reported here, COMPASS is required to maintain antisense transcription whereas this does not seem to be the case for the cryptic transcription observed at the GAL10-GAL1 locus (Pinskaya et al. 2009).

Distinct roles for H3K4me2 and H3K4me3

The comparison of different COMPASS mutations carried out here, facilitates distinguishing between the roles of different H3K4 methylation states. All mutants with grossly lowered or completely absent H3K4me3 exhibit decreased antisense transcription, but this only results in derepression of the coding gene if H3K4me2 is also abolished. The positive role of H3K4me3 on antisense transcription fits with the correlation observed between the presence of this mark and promoter activity of coding genes (Schneider et al. 2004; Bernstein et al. 2005; Kim et al. 2005; Pokholok et al. 2005; Roh et al. 2006; Barski et al. 2007). The results also indicate a prominent but independent role for the H3K4me2 mark in facilitating repression. This fits with several recent studies suggesting mechanisms through which H3K4me2 may play a

repressive role. For example, it has recently been reported that H3K4me2 in the body of active genes is recognized by the Set3 complex, leading to histone deacetylation, a repressive chromatin state (Kim and Buratowski 2009). A different histone deacetylase, Rpd3, has been implicated in the repressive role involving Set1 on the GAL10-GAL1 locus (Pinskaya et al. 2009). Furthermore, methylation of H3K4 protects against an H3 tail endopeptidase recently described in *S. cerevisiae* and humans that facilitates transcription initiation and precedes histone eviction (Duncan et al. 2008; Santos-Rosa et al. 2009). All these possible mechanisms fit with the observation made here that globally reducing H3 and H4 levels mimics the derepression of COMPASS mutants. Although more work is therefore required to pinpoint the mechanisms that lie further downstream, COMPASS exemplifies the growing insight that the roles of histone modifications in gene expression are nonlinear and extremely context-dependent (Sims and Reinberg 2008).

Materials and Methods

Microarray data is accessible through the public microarray database ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/microarray/>) under accession number E-TABM-486. The Reviewer's user account is: Username: Reviewer_E-TABM-486, Password: 1213260430149. The accession numbers below refer to detailed protocols in ArrayExpress.

Strains and plasmids

Strains and plasmids used in this study are described in Supplemental Table 4 and 5 respectively.

Histone purification and Western blotting

Histones were purified as described (Dehe et al. 2005), subjected to 16% SDSpolyacrylamide gel electrophoresis, and either Coomassie Blue stained or transferred to 0.2 μ m ProtranR nitrocellulose. Antibodies used to detect mono-, di- and trimethylated H3K4 and histone H3 were from Abcam.

Cultures

Two independent colonies of each strain were first inoculated and grown overnight in synthetic complete medium with 2% glucose. For the mid-log/steady-state experiment, larger

cultures were inoculated the next day at an OD600 of 0.15 in fresh medium, allowed to grow at 30°C and harvested at OD600 0.6, (P-UMCU-36). For the time-course experiment, overnight cultures were used to inoculate 50 ml cultures at an OD600 of 0.15. These were allowed to deplete glucose by growing for 24 hours and were used the next day to start 500 ml cultures at an OD600 of 0.15 in fresh medium for the time-course sampling (P-UMCU-47).

RNA isolation and amplification

Total RNA isolation was by hot acid phenol (P-UMCU-37) and cleaned up using RNeasy (Qiagen). Before amplification, external RNA controls were added to total RNA to check for global shifts in mRNA levels (van de Peppel et al. 2003). cRNA amplification and labelling using amino-allyl UTP was performed on a Caliper robot system (P-UMCU-38).

Microarrays and hybridizations

Each sample was generated twice, as independent biological replicates. These were hybridized in dye-swap against a common wt reference RNA (P-UMCU-39) on oligoarrays that represented each gene twice (P-UMCU-34). After scanning (P-UMCU-40), raw data were extracted with Imagene (Biodiscovery) (P-UMCU-42).

Data analysis

Since spike-in of external RNA controls revealed no global changes in the mRNA population (van de Peppel et al. 2003) for the mid-log experiment, non-background corrected data were normalized with print-tip LOESS (Yang et al. 2002) on gene probes with a span of 0.4 (P-UMCU-41). For the time-course, all features, including negative and external controls (EC) except EC 4, 6 and 8, were used for the estimation of the LOESS curve (P-UMCU-46). Probes flagged as absent, or with a nearly saturated signal were not used to estimate the LOESS curve. For differential expression analysis, the LIMMA package (Smyth et al. 2005) was used. Mitochondrial-encoded genes and Ty elements were excluded due to their high biological variation. Genes with an FDR-adjusted p-value less than 0.01 and a foldchange of more than 1.7 were considered significant. For the time-course experiment, changes were considered significant if they fulfilled these criteria for two consecutive time-points. Hierarchical clustering was by MeV (Saeed et al. 2003), using standard correlation and average linkage.

For the H3K4 methylation ChIP-chip analysis, the data are from (Kirmizis et al. 2007). For each gene, a region corresponding to the ORF plus 500 bps in both directions was used. The ORF was divided into 30 bins of equal length and the flanking regions in 10 bins each. A loess algorithm (Team 2007) with a span of 0.2 was used to estimate the enrichment of the methylation marks for every bin.

For the enrichment analysis, a right-sided Fisher's exact test was used and the pvalues were corrected for multiple testing using Bonferroni. The GO annotations were obtained from SGD.

Reverse Transcription and qPCR

cDNAs of sense RNA or antisense RNA were generated by SuperScript II Reverse transcriptase (Invitrogen) from total RNAs using gene and strand-specific primers. For each gene, cDNAs obtained from the reverse transcription of sense or antisense RNA were quantified by a real-time qPCR with gene-specific primers corresponding to a 150 bp fragment (Fig. 4B). The same primers were used to quantify sense and antisense cDNA of each gene. The position and the sequence of each primer are indicated in Figure 4B and Supplemental Table 5.

Acknowledgements

We thank Maria Hobeika and members of A. Morillon's and M. Timmers' laboratories for helpful discussions and their input in this work. VG and CD laboratories are supported by the "Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC), (équipes labellisées)" and CD is funded by a grant from the Agence Nationale pour la Recherche (BLAN06- 1_134099). VO is recipient of a fellowship from the LNCC and AVP is supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

References

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129(4): 823-837.

- Berger, S.L. 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447(7143): 407-412.
- Bernstein, B.E., Humphrey, E.L., Erlich, R.L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J.S., Kouzarides, T., and Schreiber, S.L. 2002. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(13): 8695-8700.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L., and Lander, E.S. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120(2): 169-181.
- Berretta, J., Pinskaya, M., and Morillon, A. 2008. A cryptic unstable transcript mediates transcriptional trans-silencing of the Ty1 retrotransposon in *S. cerevisiae*. *Genes & development* 22(5): 615-626.
- Boa, S., Coert, C., and Patterson, H.G. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* Set1p is a methyltransferase specific for lysine 4 of histone H3 and is required for efficient gene expression. *Yeast (Chichester, England)* 20(9): 827-835.
- Briggs, S.D., Bryk, M., Strahl, B.D., Cheung, W.L., Davie, J.K., Dent, S.Y., Winston, F., and Allis, C.D. 2001. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* 15(24): 3286-3295.
- Camblong, J., Beyrouthy, N., Guffanti, E., Schlaepfer, G., Steinmetz, L.M., and Stutz, F. 2009. Trans-acting antisense RNAs mediate transcriptional gene cosuppression in *S. cerevisiae*. *Genes & development* 23(13): 1534-1545.
- Camblong, J., Iglesias, N., Fickentscher, C., Dieppo, G., and Stutz, F. 2007. Antisense RNA stabilization induces transcriptional gene silencing via histone deacetylation in *S. cerevisiae*. *Cell* 131(4): 706-717.
- Cordeiro, Y., Schramke, V., Longhese, M.P., Smokvina, T., Paciotti, V., Brevet, V., Gilson, E., and Geli, V. 1999. Interaction between Set1p and checkpoint protein Mec3p in DNA repair and telomere functions. *Nature genetics* 21(2): 204-208.
- Couture, J.F., Collazo, E., and Trievel, R.C. 2006. Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5. *Nature structural & molecular biology* 13(8): 698-703.

- Dai, J., Hyland, E.M., Yuan, D.S., Huang, H., Bader, J.S., and Boeke, J.D. 2008. Probing nucleosome function: a highly versatile library of synthetic histone H3 and H4 mutants. *Cell* 134(6): 1066-1078.
- Dehe, P.M., Dichtl, B., Schaft, D., Roguev, A., Pamblanco, M., Lebrun, R., Rodriguez-Gil, A., Mkandawire, M., Landsberg, K., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Rosaleny, L.E., Tordera, V., Chavez, S., Stewart, A.F., and Geli, V. 2006. Protein interactions within the Set1 complex and their roles in the regulation of histone 3 lysine 4 methylation. *The Journal of biological chemistry* 281(46): 35404-35412.
- Dehe, P.M. and Geli, V. 2006. The multiple faces of Set1. *Biochemistry and cell biology Biochimie et biologie cellulaire* 84(4): 536-548.
- Dehe, P.M., Pamblanco, M., Luciano, P., Lebrun, R., Moinier, D., Sendra, R., Verreault, A., Tordera, V., and Geli, V. 2005. Histone H3 lysine 4 monomethylation does not require ubiquitination of histone H2B. *Journal of molecular biology* 353(3): 477-484.
- Dover, J., Schneider, J., Tawiah-Boateng, M.A., Wood, A., Dean, K., Johnston, M., and Shilatifard, A. 2002. Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *The Journal of biological chemistry* 277(32): 28368-28371.
- Duncan, E.M., Muratore-Schroeder, T.L., Cook, R.G., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Allis, C.D. 2008. Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell* 135(2): 284-294.
- Flanagan, J.F., Mi, L.Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K.L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F., and Khorasanizadeh, S. 2005. Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* 438(7071): 1181-1185.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S.M., and Grunstein, M. 1995. Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 80(4): 583- 592.
- Houseley, J., Rubbi, L., Grunstein, M., Tollervey, D., and Vogelauer, M. 2008. A ncRNA modulates histone modification and mRNA induction in the yeast GAL gene cluster. *Molecular cell* 32(5): 685-695.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. 2001. Translating the histone code. *Science (New York, NY)* 293(5532): 1074-1080.

- Kim, J., Hake, S.B., and Roeder, R.G. 2005. The human homolog of yeast BRE1 functions as a transcriptional coactivator through direct activator interactions. *Molecular cell* 20(5): 759-770.
- Kim, T. and Buratowski, S. 2009. Dimethylation of H3K4 by Set1 recruits the Set3 histone deacetylase complex to 5' transcribed regions. *Cell* 137(2): 259-272.
- Kirmizis, A., Santos-Rosa, H., Penkett, C.J., Singer, M.A., Vermeulen, M., Mann, M., Bahler, J., Green, R.D., and Kouzarides, T. 2007. Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature* 449(7164): 928-932.
- Kornberg, R.D. and Lorch, Y. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98(3): 285-294.
- Krogan, N.J., Dover, J., Khorrami, S., Greenblatt, J.F., Schneider, J., Johnston, M., and Shilatifard, A. 2002. COMPASS, a histone H3 (Lysine 4) methyltransferase required for telomeric silencing of gene expression. *The Journal of biological chemistry* 277(13): 10753-10755.
- Lachner, M. and Jenuwein, T. 2002. The many faces of histone lysine methylation. *Current opinion in cell biology* 14(3): 286-298.
- Lee, J.S., Shukla, A., Schneider, J., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Florens, L., Bhaumik, S.R., and Shilatifard, A. 2007. Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell* 131(6): 1084-1096.
- Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell* 128(4): 707-719.
- Li, H., Ilin, S., Wang, W., Duncan, E.M., Wysocka, J., Allis, C.D., and Patel, D.J. 2006. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* 442(7098): 91-95.
- Martin, D.G., Grimes, D.E., Baetz, K., and Howe, L. 2006. Methylation of histone H3 mediates the association of the NuA3 histone acetyltransferase with chromatin. *Molecular and cellular biology* 26(8): 3018-3028.
- Meneghini, M.D., Wu, M., and Madhani, H.D. 2003. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 112(5): 725-736.
- Miller, T., Krogan, N.J., Dover, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Johnston, M., Greenblatt, J.F., and Shilatifard, A. 2001. COMPASS: a complex of proteins

- associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(23): 12902- 12907.
- Morillon, A., Karabetsou, N., Nair, A., and Mellor, J. 2005. Dynamic lysine methylation on histone H3 defines the regulatory phase of gene transcription. *Molecular cell* 18(6): 723-734.
- Nagy, P.L., Griesenbeck, J., Kornberg, R.D., and Cleary, M.L. 2002. A trithorax group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(1): 90-94.
- Neil, H., Malabat, C., d'Aubenton-Carafa, Y., Xu, Z., Steinmetz, L.M., and Jacquier, A. 2009. Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature* 457(7232): 1038-1042.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., and Struhl, K. 2003. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Molecular cell* 11(3): 709-719.
- Nislow, C., Ray, E., and Pillus, L. 1997. SET1, a yeast member of the trithorax family, functions in transcriptional silencing and diverse cellular processes. *Molecular biology of the cell* 8(12): 2421-2436.
- Pinskaya, M., Gourvennec, S., and Morillon, A. 2009. H3 lysine 4 di- and trimethylation deposited by cryptic transcription attenuates promoter activation. *The EMBO journal* 28(12): 1697-1707.
- Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D.K., and Young, R.A. 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122(4): 517-527.
- Pray-Grant, M.G., Daniel, J.A., Schieltz, D., Yates, J.R., 3rd, and Grant, P.A. 2005. Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* 433(7024): 434-438.
- Roguev, A., Schaft, D., Shevchenko, A., Pijnappel, W.W., Wilm, M., Aasland, R., and Stewart, A.F. 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *The EMBO journal* 20(24): 7137-7148.

- Roh, T.Y., Cuddapah, S., Cui, K., and Zhao, K. 2006. The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(43): 15782-15787.
- Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Wysocka, J. 2007. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Molecular cell* 25(1): 15-30.
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., and Quackenbush, J. 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* 34(2): 374-378.
- Santos-Rosa, H., Bannister, A.J., Dehe, P.M., Geli, V., and Kouzarides, T. 2004. Methylation of H3 lysine 4 at euchromatin promotes Sir3p association with heterochromatin. *The Journal of biological chemistry* 279(46): 47506-47512.
- Santos-Rosa, H., Kirmizis, A., Nelson, C., Bartke, T., Saksouk, N., Cote, J., and Kouzarides, T. 2009. Histone H3 tail clipping regulates gene expression. *Nature structural & molecular biology* 16(1): 17-22.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. 2002. Active genes are trimethylated at K4 of histone H3. *Nature* 419(6905): 407-411.
- Schneider, J., Wood, A., Lee, J.S., Schuster, R., Dueker, J., Maguire, C., Swanson, S.K., Florens, L., Washburn, M.P., and Shilatifard, A. 2005. Molecular regulation of histone H3 trimethylation by COMPASS and the regulation of gene expression. *Molecular cell* 19(6): 849-856.
- Schneider, R., Bannister, A.J., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C., and Kouzarides, T. 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nature cell biology* 6(1): 73-77.
- Shi, X., Hong, T., Walter, K.L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Pena, P., Lan, F., Kaadige, M.R., Lacoste, N., Cayrou, C., Davrazou, F., Saha, A., Cairns, B.R., Ayer, D.E., Kutateladze, T.G., Shi, Y., Cote, J., Chua, K.F., and Gozani, O. 2006. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442(7098): 96-99.

- Sims, R.J., 3rd, Millhouse, S., Chen, C.F., Lewis, B.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Manley, J.L., and Reinberg, D. 2007. Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Molecular cell* 28(4): 665-676.
- Sims, R.J., 3rd and Reinberg, D. 2008. Is there a code embedded in proteins that is based on post-translational modifications? *Nature reviews* 9(10): 815-820.
- Smyth, G.K., Gentleman, R., Carey, V., Dudoit, S., Irizarry, R., and Huber, W. 2005. Limma: linear models for microarray data. in *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, pp. 397-420. Springer, New York.
- Sollier, J., Lin, W., Soustelle, C., Suhre, K., Nicolas, A., Geli, V., and de La Roche Saint-Andre, C. 2004. Set1 is required for meiotic S-phase onset, doublestrand break formation and middle gene expression. *The EMBO journal* 23(9): 1957-1967.
- Steward, M.M., Lee, J.S., O'Donovan, A., Wyatt, M., Bernstein, B.E., and Shilatifard, A. 2006. Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nature structural & molecular biology* 13(9): 852- 854.
- Sun, Z.W. and Allis, C.D. 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418(6893): 104-108.
- Taverna, S.D., Ilin, S., Rogers, R.S., Tanny, J.C., Lavender, H., Li, H., Baker, L., Boyle, J., Blair, L.P., Chait, B.T., Patel, D.J., Aitchison, J.D., Tackett, A.J., and Allis, C.D. 2006. Yng1 PHD finger binding to H3 trimethylated at K4 promotes NuA3 HAT activity at K14 of H3 and transcription at a subset of targeted ORFs. *Molecular cell* 24(5): 785-796.
- Team, R.D.C. 2007. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, Vienna, Austria. van de Peppel, J., Kemmeren, P., van Bakel, H., Radonjic, M., van Leenen, D., and Holstege, F.C. 2003. Monitoring global messenger RNA changes in externally controlled microarray experiments. *EMBO reports* 4(4): 387-393.
- Venkatasubrahmanyam, S., Hwang, W.W., Meneghini, M.D., Tong, A.H., and Madhani, H.D. 2007. Genome-wide, as opposed to local, antisilencing is mediated redundantly by the euchromatic factors Set1 and H2A.Z. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(42): 16609-16614.
- Vermeulen, M., Mulder, K.W., Denissov, S., Pijnappel, W.W., van Schaik, F.M., Varier, R.A., Baltissen, M.P., Stunnenberg, H.G., Mann, M., and Timmers, H.T. 2007.

- Selective anchoring of TFIIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* 131(1): 58-69.
- Vitaliano-Prunier, A., Menant, A., Hobeika, M., Geli, V., Gwizdek, C., and Dargemont, C. 2008. Ubiquitylation of the COMPASS component Swd2 links H2B ubiquitylation to H3K4 trimethylation. *Nature cell biology* 10(11): 1365-1371.
- Wijaya, E., Yiu, S.M., Son, N.T., Kanagasabai, R., and Sung, W.K. 2008. MotifVoter: a novel ensemble method for fine-grained integration of generic motif finders. *Bioinformatics (Oxford, England)* 24(20): 2288-2295.
- Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T.A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A.L., Roeder, R.G., Brivanlou, A.H., and Allis, C.D. 2005. WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121(6): 859-872.
- Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T.A., Kwon, S.Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A.J., Chait, B.T., Badenhorst, P., Wu, C., and Allis, C.D. 2006. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* 442(7098): 86-90.
- Xu, Z., Wei, W., Gagneur, J., Perocchi, F., Clauder-Munster, S., Camblong, J., Guffanti, E., Stutz, F., Huber, W., and Steinmetz, L.M. 2009. Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast. *Nature* 457(7232): 1033- 1037.
- Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T.P. 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic acids research* 30(4): e15.
- Zhang, H., Roberts, D.N., and Cairns, B.R. 2005. Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* 123(2): 219-231.

Figure Legends

Figure 1. Loss of H3K4 di- and trimethylation results in upregulation of a subset of genes. (A) Commassie-stained gel of purified histones from the indicated strains (top) and western blots with antibodies directed against H3 carboxy-terminus and the different H3K4 methylation states (bottom). (B) Hierarchical clustering of all genes with significantly

changed mRNA expression (p-value less than 0.01 and fold-change versus wild-type more than 1.7) in any single COMPASS mutant, excluding the deleted genes. Fold-change of mRNA expression in mutant versus wild-type is indicated by the colour bar as log₂ values. (C) Genes depicted in the same order as in B for the H3K4R point mutant and *bre1*.

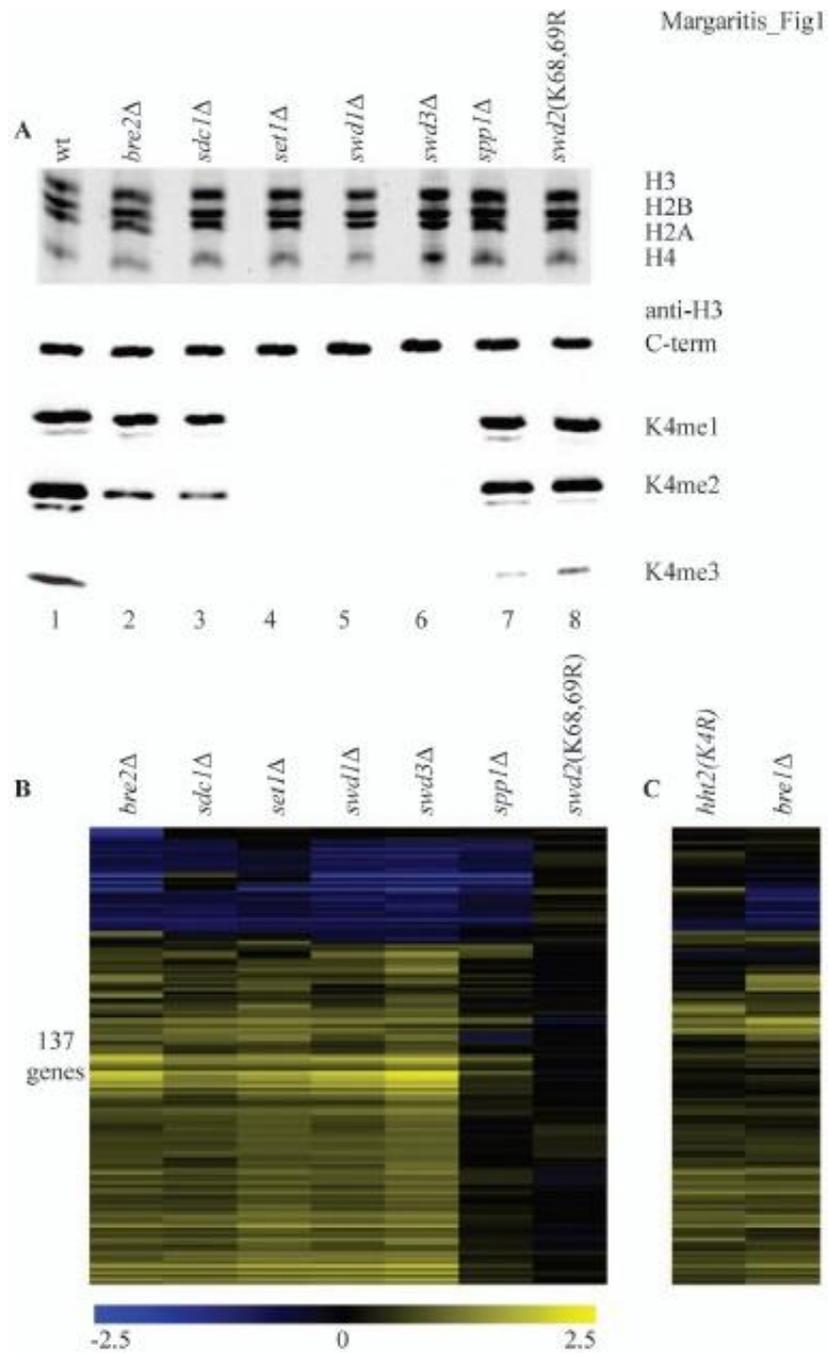
Figure 2. Loss of H3K4 di- and trimethylation leads to a slight delay in repression kinetics for a subset of genes. (A) Hierarchical clustering of all genes with significant changes in mRNA expression during the shift from low to high glucose in either the wt, *spp1*, and *set1* time-courses. The log₂ values correspond to the difference with the zero time point of each time-course. (B) Hierarchical clustering of genes with delayed repression compared to wt. These genes were selected based on significant differences between the mutant and wt time-courses (Materials and Methods). The first three panels show the differences in expression versus the wt zero time point. The last two panels (*spp1*. vs wt) or (*set1*. vs wt) depict the differences between the mutant and the wt at the same time point. The delay in repression kinetics is observed later for genes that are repressed later (blue bar) and earlier for genes that are repressed fast (yellow bar). (C) Hierarchical clustering of all 26 genes that show some delay in activation. (D) Graphs of the genes represented by the yellow bar in B to exemplify those genes that show the clearest delay in repression. The values depicted (M) are the same log₂ ratios depicted in the corresponding panels in B.

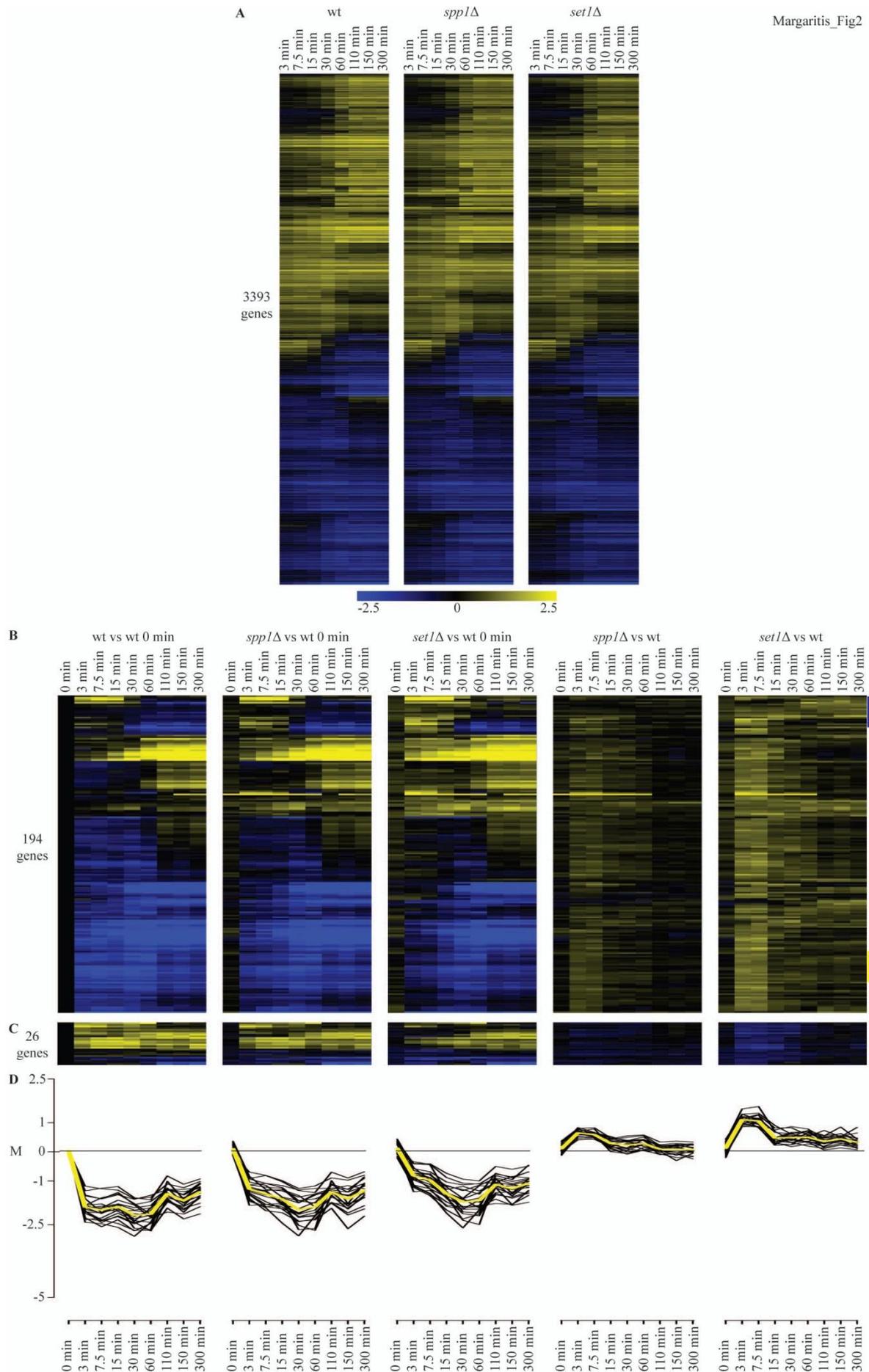
Figure 3. COMPASS-repressed genes have aberrant H3K4 methylation patterns, indicative of 3'-end antisense transcription. The upper panel shows the average enrichment of H3K4me1 (blue), H3K4me2 (red) and H3K4me3 (grey) over H3, for the set of 47 COMPASS-repressed genes that show at least a two-fold enrichment of H3K4me2 or H3K4me3 somewhere across the gene or flanking region (Kirmizis et al. 2007). The lower panel shows heatmaps of H3K4me3 patterns of individual genes. AMS1, PHO84 and YGR110W are marked by 1 to 3, respectively.

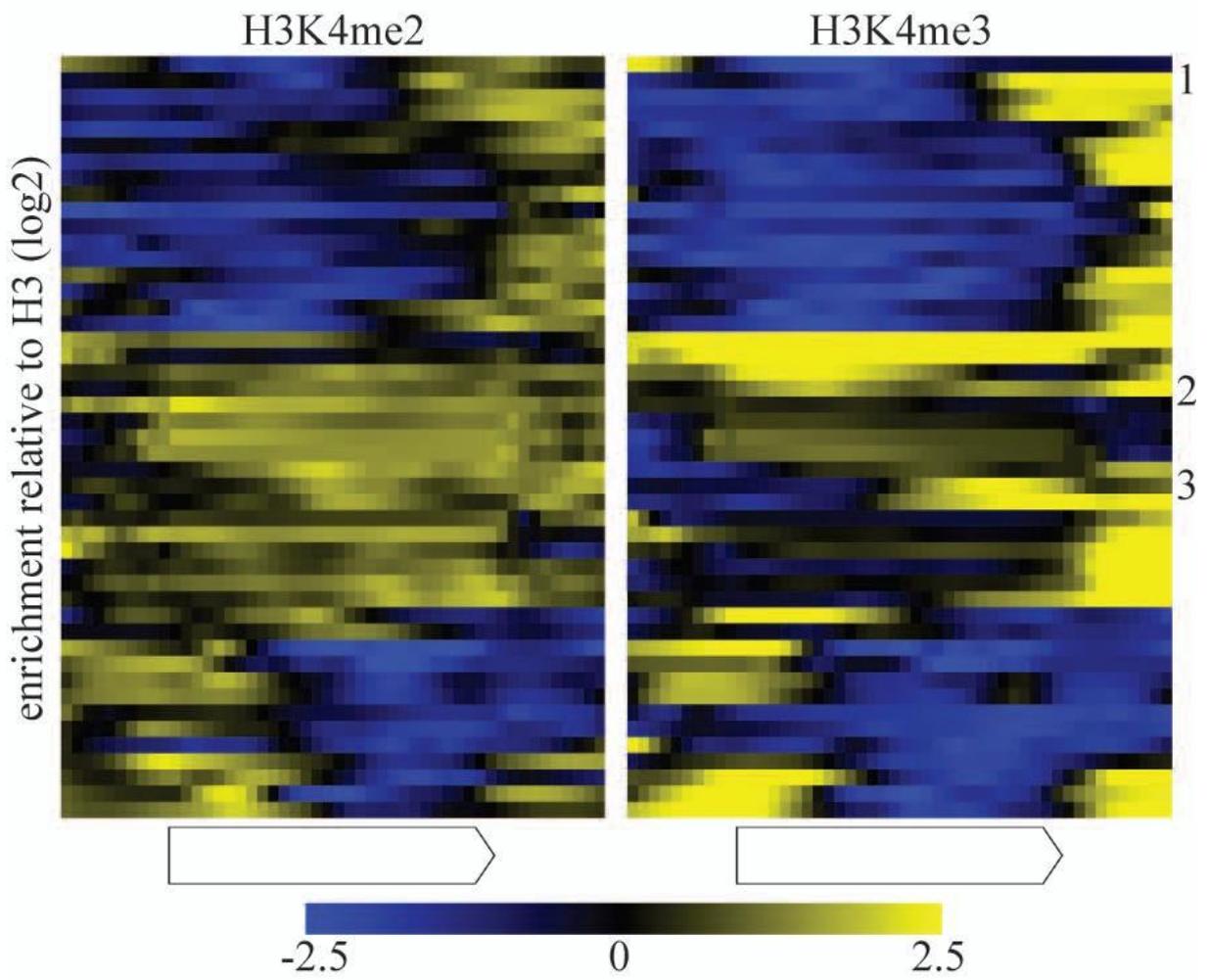
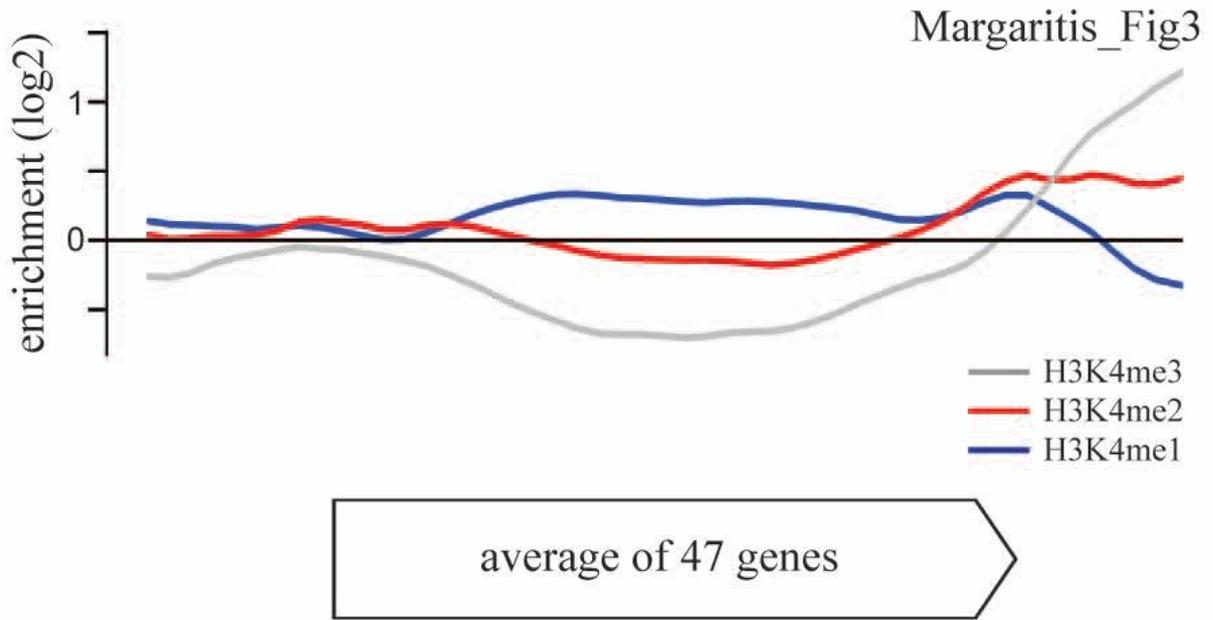
Figure 4. COMPASS repression is mediated through 3'-end antisense transcriptional gene silencing. (A) Hierarchical clustering of all genes up-regulated in at least two COMPASS mutants in the *rrp6*., *set1*. and the *set1*. *rrp6*. strains. AMS1, PHO84 and YGR110W are marked by 1 to 3, respectively. The black bar marks genes where the two mutations are epistatic. Three quarters of these genes are related to phosphate metabolism. (B) Schematic

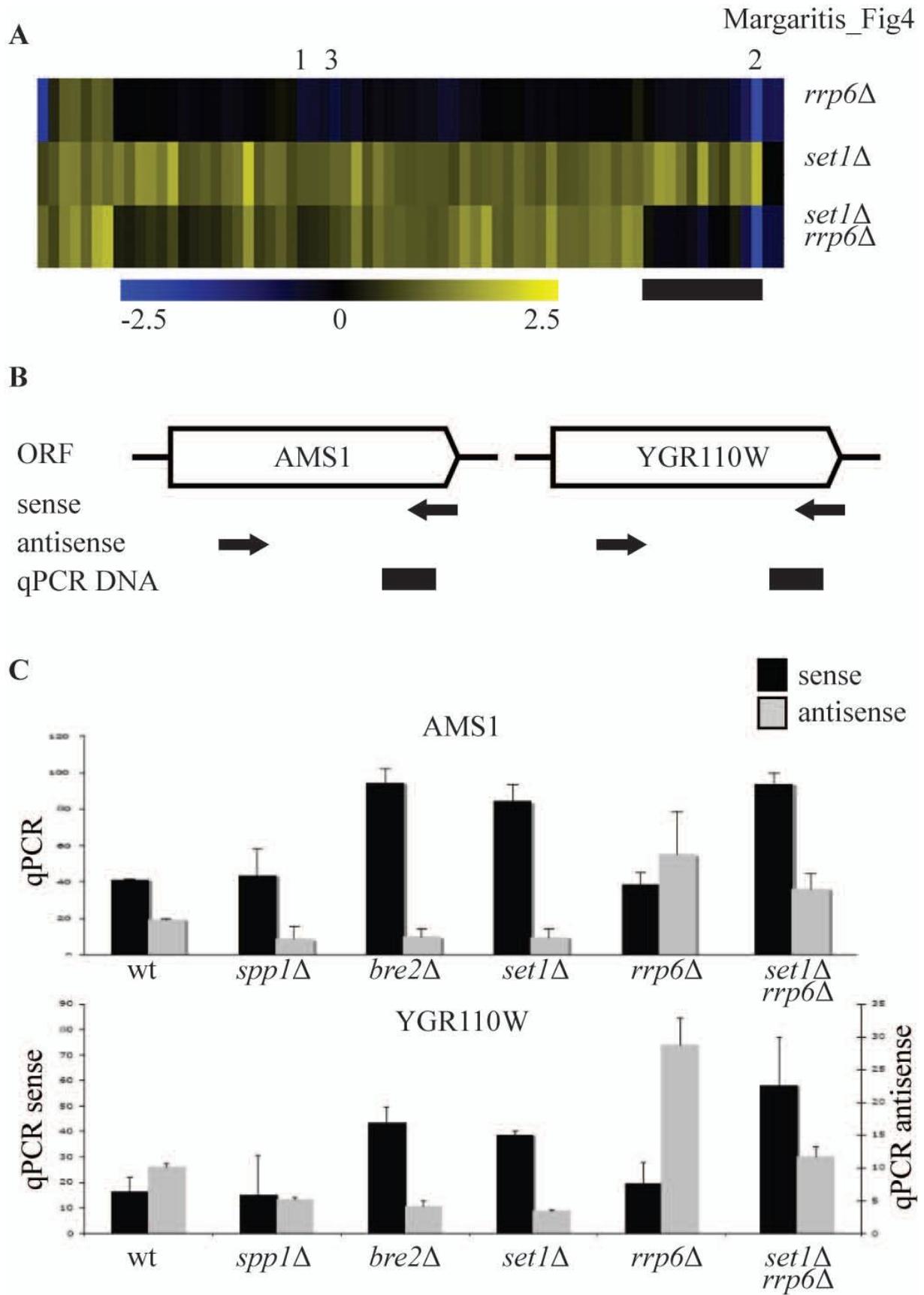
representation of AMS1 and YGR110W. The position of the primers used for strand-specific RT-PCR are shown by arrows, while the black boxes indicate the location of the DNA fragment produced during the qPCR. (C) Sense and antisense RNA levels analyzed by qPCR in indicated backgrounds. Error bars reflect standard deviations of an average signal obtained from at least two independent experiments.

Figure 5. COMPASS-repressed genes are derepressed upon decrease in nucleosome content. (A) The cellular expression level of H3 was analyzed by Western blotting in wt and hht1. hhf1. cells. (B) Correlation of the effects of low nucleosomes levels (hht1. hhf1.) and SET1 deletion (set1.) on the COMPASS-repressed genes. LYS2 is excluded as it is used as an auxotrophic marker for the hht1. hhf1. strain. PHO84 is marked, as it is significantly repressed in the low nucleosome strain. The two histone genes are also depicted.









Margaritis_Fig5

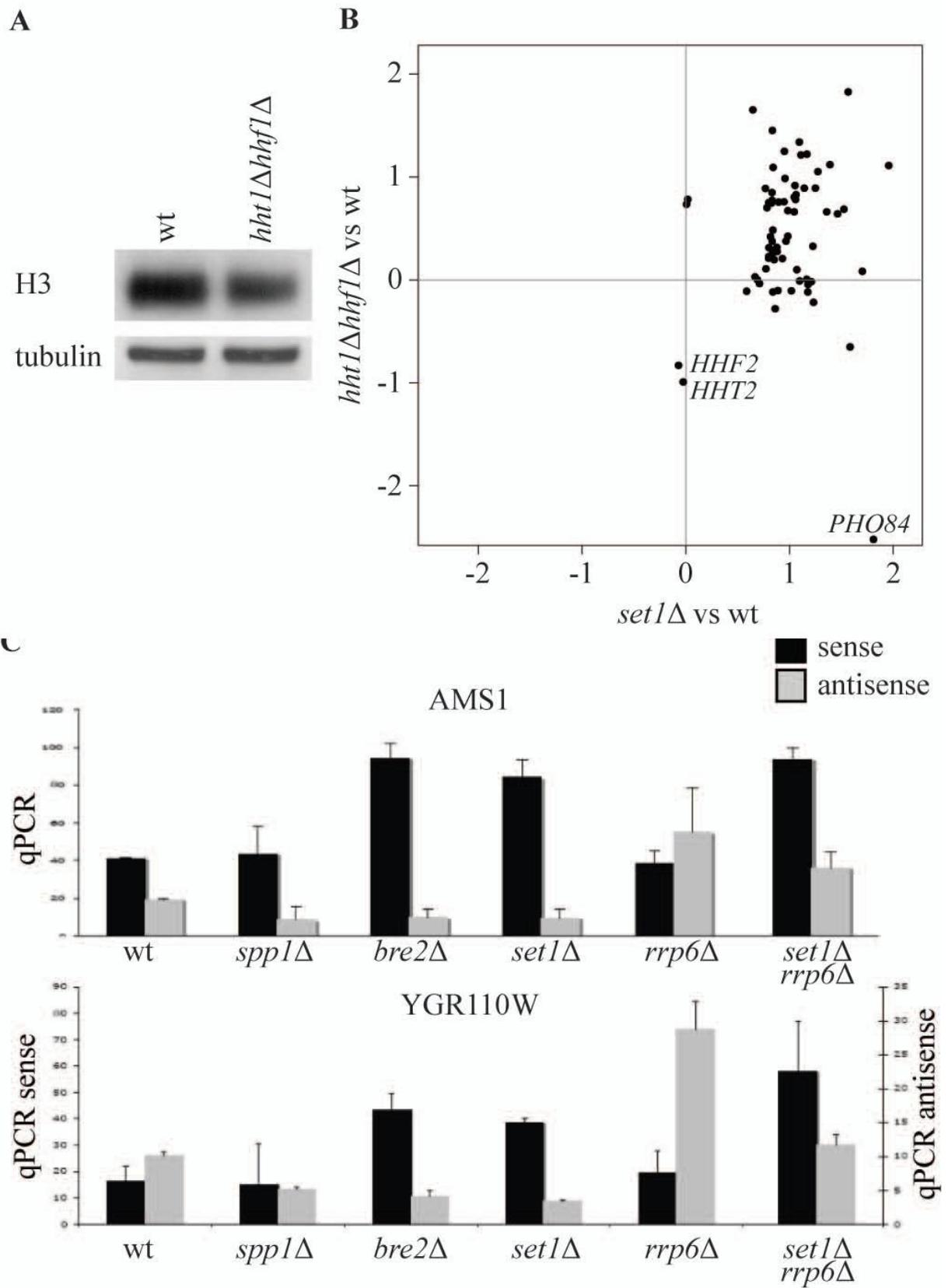


Figure S1. COMPASS-repressed genes are enriched near telomeres. The histogram shows the genomic location of the 69 genes significantly upregulated in at least two COMPASS deletion mutants. The bars represent the numbers of genes found in 5-kb intervals from nearest chromosome end. The line represents the \log_{10} p-value as a function of distance to the nearest chromosome end. Note that the scale of \log_{10} p-values runs from 0 to -15 so that the height of the line corresponds to higher significance.

Figure S2. H3K4 methylation patterns demarcate antisense transcription. Patterns of H3K4 methylation (Kirmizis et al. 2007) expressed as \log_2 of each methylation mark over H3 (top panels). Mapping of non-coding antisense transcripts (Xu et al. 2009), with coding regions indicated in red and non-coding transcripts in blue (bottom panels).

Table S1. The 69 COMPASS-repressed genes and their distance from the nearest chromosome end.

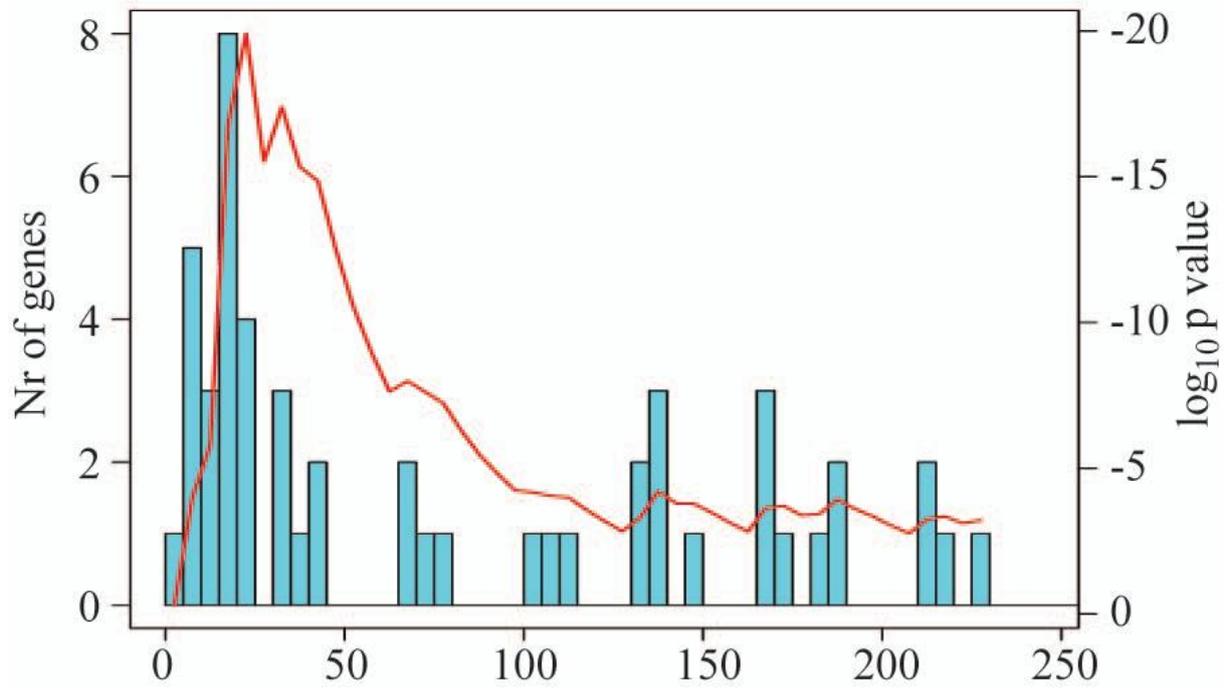
Table S2. Evidence for the presence of ncRNAs in the COMPASS-repressed genes that have H3K4me2/3 levels more than 2-fold over H3. The evidence for non-coding transcription is based on (Neil et al. 2009; Xu et al. 2009). Three types of non-coding RNAs were reported: antisense transcripts spanning the body of the gene (antisense), transcripts in the promoter of the genes (promoter) and known noncoding transcripts (SGD). “No data available” indicates cases when the above studies didn’t include the regions of specific genes in their results.

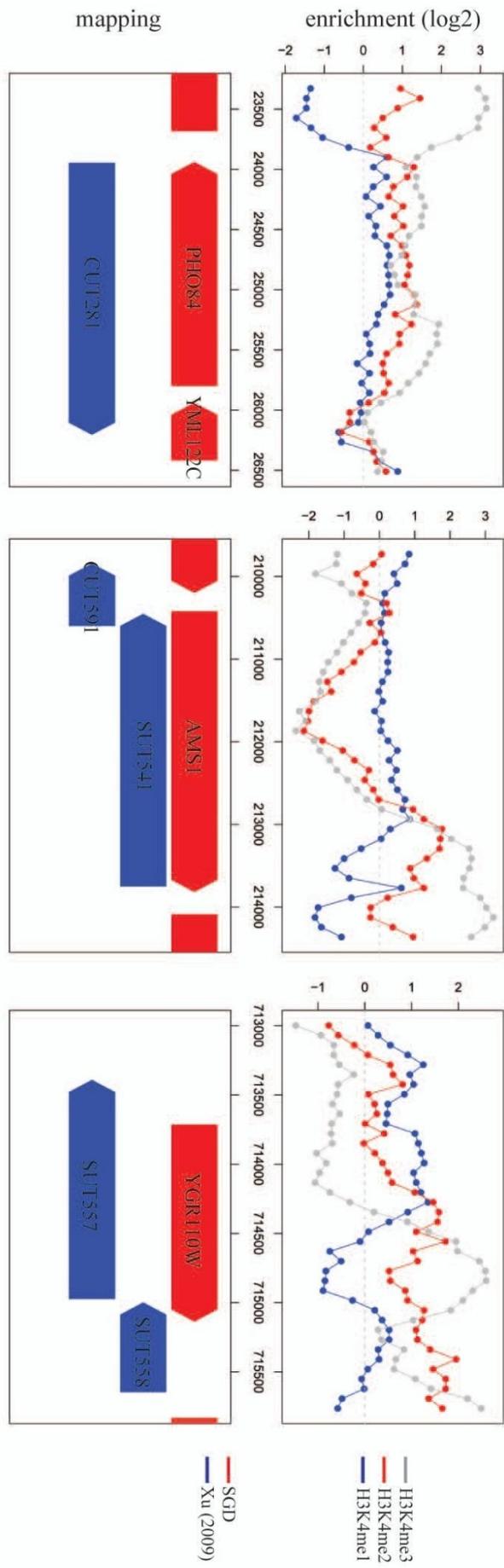
Table S3. The 69 COMPASS-repressed genes are enriched in specific Gene Ontology functional categories. The number of co-occurrences between functional categories and the repressed genes (Hits), the corresponding genes (Annotated Genes), the number of background hits, as well as the corresponding Bonferroni-corrected p-values (Cor. p-val) are reported.

Table S4. Strains and plasmids used in this study.

Table S5. Primers used in this study.

Margaritis_SupFig1





Margaritis_SupFig2

systematic name	gene symbol	Distance (bp)
YAR071W	PHO11	4056
YMR322C	SNO4	5709
YKL221W	MCH2	6819
YDL246C	SOR2	9220
YHR215W	PHO12	9843
YFL061W	DDI3	9884
YCR102C	YCR102C	11706
YPL280W	HSP32	12244
YFL058W	THI5	13440
YNL332W	THI12	15343
YBR296C	PHO89	15524
YJR156C	THI11	16666
YDL244W	THI13	16715
YJL221C	YJL221C	17652
YIL172C	YIL172C	17669
YPL276W	YPL276W	18167
YPL275W	YPL275W	18724
YDL241W	YDL241W	20821
YOL157C	YOL157C	23409
YIL169C	YIL169C	24613
YML123C	PHO84	24920
YOL155C	HPF1	30154
YIR027C	DAL1	32937
YNR064C	YNR064C	34761
YBL098W	BNA4	39833
YEL059C-A	SOM1	42512
YAR031W	PRM9	42930
YCL030C	HIS4	67134
YFR023W	PES4	69369
YCL026C-B	HBN1	73696
YGR260W	TNA1	77653
YJL170C	ASG7	101459
YDL196W	YDL196W	106907
YFL012W	YFL012W	110864
YGR234W	YHB1	130439
YGR233C	PHO81	134501
YHR015W	MIP6	135537
YBL043W	ECM13	137078
YLL005C	SPO75	139242
YKL162C-A	YKL162C-A	146003
YJR079W	YJR079W	165030
YJR078W	BNA2	166212
YMR244W	YMR244W	166647
YBR208C	DUR1,2	173727
YNL018C	YNL018C	183477
YHR137W	ARO9	186161
YHR136C	SPL2	187763
YGL156W	AMS1	212047
YHR053C	CUP1-2	212630
YHR055C	CUP1-2	214628
YOL058W	ARG1	219841
YPL171C	OYE3	226769
YDR403W	DIT1	256519
YER072W	VTC1	273871
YBR148W	YSW1	274394
YGR144W	THI4	310052
YBR040W	FIG1	317416
YBR045C	GIP1	329230
YBR047W	FMP23	332095
YLR307W	CDA1	332101
YBR115C	LYS2	341347
YJL037W	IRC18	368751
YJL038C	YJL038C	370306
YGR110W	YGR110W	376565
YDL039C	PRM7	382157
YDL038C	YDL038C	383203
YPL019C	VTC3	432300
YGR059W	SPR3	482610
YDR281C	PHM6	509758

systematic name	gene symbol	Xu(2009)	Neil(2009)	Type
YAR031W	PRM9	no data available	no data available	no data available
YAR071W	PHO11	likely	likely	antisense
YBL098W	BNA4	likely	yes	antisense
YBR040W	FIG1	not detected	not detected	not detected
YBR047W	FMP23	likely	yes	antisense
YBR115C	LYS2	yes	yes	promoter
YBR148W	YSW1	yes	yes	antisense
YBR208C	DUR1,2	not detected	not detected	not detected
YCL026C-B	HBN1	likely	likely	promoter
YCL030C	HIS4	yes	yes	promoter
YCR102C	YCR102C	yes	not detected	antisense
YDL039C	PRM7	yes	yes	antisense
YDL196W	YDL196W	likely	likely	antisense
YDL241W	YDL241W	yes	yes	antisense
YDR281C	PHM6	likely	yes	antisense
YDR403W	DIT1	yes	yes	antisense
YEL059C-A	SOM1	likely	likely	antisense
YER072W	VTC1	yes	yes	antisense and promoter
YFL012W	YFL012W	yes	yes	promoter and antisense
YFL081W	DDI3	no data available	no data available	no data available
YGL156W	AMS1	yes	yes	antisense and promoter
YGR059W	SPR3	yes	yes	antisense
YGR110W	YGR110W	yes	not detected	antisense and promoter
YGR144W	THI4	yes	yes	antisense and promoter
YGR233C	PHO81	yes	yes	promoter
YGR234W	YHB1	yes	yes	promoter
YGR260W	TNA1	yes	likely	promoter
YHR015W	MIP8	likely	likely	antisense
YHR053C	CUP1-1	no data available	not detected	ncRNA (SGD)
YHR055C	CUP1-2	no data available	not detected	ncRNA (SGD)
YHR138C	SPL2	not detected	likely	antisense
YHR137W	ARO9	yes	yes	antisense
YHR215W	PHO12	yes	yes	antisense and promoter
YIL189C	YIL189C	yes	yes	antisense
YIR027C	DAL1	yes	not detected	antisense
YJL170C	ASG7	yes	yes	antisense
YJR078W	BNA2	not detected	yes	antisense
YJR079W	YJR079W	not detected	yes	antisense
YKL221W	MCH2	yes	not detected	antisense
YLL005C	SPO75	not detected	likely	antisense
YML123C	PHO84	yes	yes	antisense and promoter
YMR244W	YMR244W	not detected	likely	antisense
YOL058W	ARG1	yes	yes	antisense
YOL155C	HPF1	yes	yes	antisense
YOL157C	YOL157C	yes	yes	antisense
YPL019C	VTC3	likely	yes	antisense and promoter
YPL171C	OYE3	yes	yes	antisense

GO-BP

Name	Cor. P-value	Hits	Backgr. Hits	Annotated Genes
thiamin biosynthetic process	6.22E-05	5	15	THI11, THI12, THI13, THI5, THI4
thiamin and derivative biosynthetic process	8.98E-05	5	16	THI11, THI12, THI13, THI5, THI4
thiamin metabolic process	1.26E-04	5	17	THI11, THI12, THI13, THI5, THI4
thiamin and derivative metabolic process	1.73E-04	5	18	THI11, THI12, THI13, THI5, THI4
vitamin biosynthetic process	4.22E-04	7	58	THI11, BNA2, BNA4, THI12, THI13, THI5, THI4
water-soluble vitamin biosynthetic process	4.22E-04	7	58	THI11, BNA2, BNA4, THI12, THI13, THI5, THI4 SNO4, THI11, BNA2, BNA4, THI12, THI13, THI5,
vitamin metabolic process	2.05E-03	8	102	THI4
response to copper ion	2.17E-03	3	5	CUP1-2, CUP1-1, YCR102C
cellular aromatic compound metabolic process	4.17E-03	9	147	ARO9, ARG1, THI12, HIS4, THI11, THI13, THI5, DAL1, THI4
aromatic compound biosynthetic process	6.57E-03	5	36	THI11, THI12, THI13, THI5, THI4
water-soluble vitamin metabolic process	1.39E-02	7	98	THI11, BNA2, BNA4, THI12, THI13, THI5, THI4
polyphosphate metabolic process	1.77E-02	3	9	VTC1, VTC3, PHO84
ascospore wall assembly	2.20E-02	5	46	CDA1, SPO75, DIT1, GIP1, SPR3
spore wall assembly	2.20E-02	5	46	CDA1, SPO75, DIT1, GIP1, SPR3
spore wall biogenesis	2.20E-02	5	46	CDA1, SPO75, DIT1, GIP1, SPR3
ascospore wall biogenesis	2.20E-02	5	46	CDA1, SPO75, DIT1, GIP1, SPR3
cell wall assembly	2.44E-02	5	47	CDA1, SPO75, DIT1, GIP1, SPR3
maltose metabolic process	3.43E-02	3	11	YOL157C, FSP2, YIL172C
heterocycle biosynthetic process	3.60E-02	6	80	THI11, THI12, THI13, THI5, THI4, HIS4
cellular nitrogen compound metabolic process	4.25E-02	13	396	LYS2, ARO9, ARG1, THI12, HIS4, DUR1.2, THI11, BNA2, BNA4, THI13, THI5, THI4, DAL1
response to toxin	4.37E-02	4	29	YHB1, THI13, THI5, YNR064C

GO-MF

Name	Cor. P-value	Hits	Backgr. Hits	Annotated Genes
alpha-glucosidase activity	4.67E-03	3	8	YOL157C, FSP2, YIL172C
glucosidase activity	6.71E-03	4	23	YOL157C, FSP2, YIL172C, HPF1
hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	7.77E-03	5	45	YOL157C, AMS1, FSP2, YIL172C, HPF1
hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	1.71E-02	5	53	YOL157C, AMS1, FSP2, YIL172C, HPF1
formate dehydrogenase activity	2.50E-02	2	3	YPL276W, FDH2
oxidoreductase activity	3.89E-02	11	322	LYS2, YHB1, YPL276W, HIS4, BNA2, BNA4, OYE3, SOR2, YCR102C, HBN1, FDH2

GO-CC

Name	Cor. P-value	Hits	Backgr. Hits	Annotated Genes
vacuolar transporter chaperone complex	3.31E-02	2	4	VTC1, VTC3

TFBS (Fraenkel)

Name	Cor. P-value	Hits	Backgr. Hits	Annotated Genes
SUM1	6.29E-05	8	66	TNA1, PES4, BNA2, YSW1, SPO75, DAL1, SPR3, PHM6
PHO4	1.88E-04	6	34	VTC3, ARO9, PHO84, PHO89, SPL2, PHM6
ARO80	1.43E-02	2	2	ARO9, SPL2

Name	Genotype	Source
<i>bre1Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bre1Δ::KANR</i>	Euroscarf
<i>bre2Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bre2Δ::KANR</i>	Euroscarf
<i>hht1Δhhf1Δ</i>	<i>MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ0</i> <i>hht1-hhf1::NatMX4 hhf2::HHTS/HHFS-</i> <i>URA3can1::MFA1pr-HIS3</i>	(Dai et al. 2008)
<i>rrp6Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rrp6Δ::HPH</i>	this study
<i>sdc1Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 sdc1Δ::KANR</i>	Euroscarf
<i>set1Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 set1Δ::KANR</i>	this study
<i>set1Δrrp6Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 set1Δ::KANR</i> <i>rrp6Δ::HPH</i>	this study
<i>spp1Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spp1Δ::KANR</i>	Euroscarf
<i>swd1Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 swd1Δ::KANR</i>	Euroscarf
<i>swd2Δ pSWD2</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 swd2Δ::KANR</i> <i>p415-LEU-SWD2-HA</i>	(Vitaliano-Prunier et al. 2008)
<i>swd2Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 swd2Δ::KANR</i>	(Vitaliano-Prunier et al. 2008)
<i>pSWD2K68,69R</i>	<i>p415-LEU- SWD2 K68,69R-HA</i>	et al. 2008)
<i>swd3Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 swd3Δ::KANR</i>	Euroscarf
wt	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
wt reference	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
<i>yAM212</i>	<i>MATa ura3-52, his3Δ20, leu2Δ, trp1Δ63 lys-128Δ,</i> <i>(hht1-hhf1)::LEU2; (hht2-hhf2)::HIS3 pRS314-HHT2-</i> <i>HHF2</i>	(Berretta et al. 2008)
<i>yAM213</i>	<i>MATa ura3-52, his3Δ20, leu2Δ, trp1Δ63 lys-128Δ,</i> <i>(hht1-hhf1)::LEU2; (hht2-hhf2)::HIS3 pRS314-hht2K4R-</i> <i>HHF2</i>	A. Morrillon lab

Primer Name	Primer sequence 5'->3'
RT Primers	
5'RT AMS1 AS	GGGTAGAATACCTGGACACG
3'RT AMS1 S	TTTGATTCGTCTCGCGTTGC
5'RT YGR110W AS	GCTTGTTTCCTCGCCCTTA
3'RT YGR110W S	GATGCCCTGAATGAGGAACA
qPCR Primers	
5'qAMS1	GGGTTTTCCACACACGGTAA
3'qAMS1	TTCGTGAGCGAGCTTAACAG
5'qYGR110W	TTCACAGCGTTCAAGATTGG
3'qYGR110W	GGGAACAAAGGATCAGCTT