Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Régulation de la transcription du génome de Schizosaccharomyces pombe

Materne, Philippe

Award date:
2010

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 17. Jul. 2025

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

Régulation de la transcription du génome de *Schizosaccharomyces pombe*

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Philippe MATERNE

Janvier 2010

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Régulation de la transcription du génome de *Schizosaccharomyces pombe*

MATERNE Philippe

Résumé

Les phosphorylations du domaine C-terminal (CTD) de l'ARN Polymérase II joue un rôle important pour coordonner la transcription et la maturation des ARN messagers. En particulier, la phosphorylation de la sérine 2 (S2P) du CTD est établie lors de la transcription des régions situées en 3' dans l'unité de transcription et permet d'optimiser le recrutement des complexes d'épissage et de poly-adénylation. Cette modification n'est toutefois pas essentielle.

Une étude à grande échelle menée au sein du laboratoire chez *Schizosaccharomyces pombe* a révélé un groupe de 115 gènes possédant un pattern de phosphorylation de la sérine 2 inhabituel, caractérisé par un enrichissement dans la région 5' non traduite.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé une approche génétique pour étudier dans quelle mesure ce profil particulier de S2P influençait le niveau de transcription des gènes *ste11* et *pap1* choisis pour les phénotypes bien connus qui résultent de variation de leur niveau d'expression.

Nous montrons que dans le cas de *ste11*, qui encode le facteur de transcription qui initie la différentiation sexuelle, l'absence de S2P empêche l'induction du gène et se traduit par un phénotype de stérilité.

Un résultat très contrasté est obtenu pour le gène *pap1*, qui encode un facteur de transcription requis pour répondre au stress oxydatif de faible amplitude. Dans ce cas, l'absence de S2P n'affecte que légèrement la transcription de *pap1*, et la sensibilité à la présence de peroxyde d'hydrogène est similaire à celle d'une souche sauvage. Une étude détaillée de la distribution de la forme S2P de l'ARN polymérase sur l'unité de transcription de *pap1* nous a amené à proposer l'hypothèse selon laquelle le niveau élevé de S2P observé sur la région 5' non traduite de *pap1* est artefactuel et résulte de la proximité de la région 3' non traduite riche en S2P du gène précédent.

La présence impérative de S2P pour l'expression transcriptionnelle de *ste11* est inédite et pose la question des mécanismes moléculaires qui la justifient. Ces questions sont discutées en fin de travail.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2010

Promoteur: D. Hermand

Remerciements

Tout d'abord il me semble utile de préciser que la liste de gens cités ici n'est ni exhaustive, ni classée par ordre de préférence, d'apparition ou encore moins alphabétique.
Je tiens particulièrement à remercier **Damien Hermand** pour le temps passé à m'apprendre à être un « bon » scientifique ; un bien vaste sujet dont je suis loin d'avoir fait le tour. Merci d'avoir toujours su trouver du positif dans les manips aux résultats inexplicables. Merci pour m'avoir laissé être autonome même si cela n'a pas toujours été évident pour moi. Merci pour les nombreuses relectures.

Je tiens également à remercier les membres du jury : **Karine Van Doninck**, **Sophie Le Blastier**, **Eric Depiereux** et **Jean-Yves Matroule**. Merci du temps passé à lire ce manuscrit. J'espère que qu'il vous plaira.

Je tiens également à remercier les membres de **l'équipe GEMO** qui sont devenus au fil des jours bien plus que des collègues. Merci plus particulièrement à **Julie Drogat**, **Fanélie Bauer**, **Maxime Devos** et **Anne-Michèle Van Damme**. Merci à eux pour les bons moments passés ensemble. Merci pour les réponses aux questions techniques. Merci pour les relectures attentives de ce manuscrit. Merci pour les fêtes : le bbq chez Fané, les dîners chez Max et le nouvel an du 11 décembre chez Ju ainsi que la bataille de peluches chez Miche-Miche. Je n'ai malheureusement pas pu assister aux deux derniers événements mais y avait été chaleureusement convié, et ça, ça fait plaisir ! Merci pour les cacaos pris ensemble, etc. Merci à **Richard Copin** d'être lui et de son ouverture aux autres (enfin à moi en tout cas), merci pour ce souper et ce bac de bière refusé.

Merci à toute **ma famille** et **mes amis** à qui j'ai parlé de levures pendant un an et qui faisaient semblant de s'intéresser. Merci plus particulièrement à **Sébastien Goessens** pour m'avoir accompagné au labo pour la réalisation de la **Fig. 12** le jour du « Namur sans frontières » . Merci à **Cédric Lefèvre** pour sa passion démesurée de l'azote liquide. Merci à mon frère **Frédéric Materne** et à **Nathalie Dekeyser** pour leurs encouragements et leur intérêt pour mon travail. Merci à mon frère **François Materne** pour son envie de voir toutes mes manips avoir un lien avec les amibes. Merci à mes parents **Jean-Paul** et **Huguette Materne** pour leur prêt inconditionnel de la voiture familiale afin de me rendre au labo, merci également pour leurs relectures attentives. Merci à **Manoëlle Bogaert** pour son soutien, sa confiance absolue dans le fait que mes levures allaient pousser, les quelques jours de détentes passés tous les deux à Bratislava et qui m'ont fait le plus grand bien. Merci à **Aline Lefèvre** pour les nombreuses Gribousines bues, elles contenaient sûrement beaucoup de levures. Merci à **Maxime Van Wonterghem** pour avoir été mon compagnon de travail alors que bien souvent les autres faisaient la fête. Merci à **Arnaud Latiers** qui, au fond de lui à toujours voulu faire la biologie ; nos discussions scientifiques en attestent. Merci à **Andrea Cataldo** d'avoir lancé tant de choses par la fenêtre alors que je chargeais un gel. Merci à **Edith Bouvier** qui, quand elle m'a donné son chèque livre Agora, n'osait pas franchir la porte du labo. Merci à **Marie-Louise** et **Cécile Materne** pour l'intérêt porté à mon travail. Merci à **Pierre-François Henrard** qui m'a accueilli pour manger avec lui lorsque je ne retrouvais plus mes copains du labo faute de lunettes. Merci à **Michaël Deghelt** pour avoir été mon parrain académique durant ces cinq années aux Facs à Namur. Merci à **Vincent Lefèvre** de m'avoir conseillé l'étude du gène *pap1* parce qu'il a un nom qui sonne bien. Merci à **Delphine Dotreppe** pour m'avoir fait découvrir qu'on était voisins. Merci à **Paul**.

Merci à **ceux que je n'ai pas eu le temps d'inclure dans cette page** de ne pas trop être fâchés.

Merci à tous les mémorants d'URBM : **Thibault Barbier**, **Benjamin Philippe**, **Marc Putman**, **François Beaufay** et **Thomas Legrand**.

Et enfin merci à **tous ceux qui liront cet ouvrage**.

« Il était une fois trois petits garçons nommés John, George et Paul, de leur nom de baptême. Ils décidèrent de se mettre ensemble parce qu'ils étaient du genre à se mettre ensemble. Quand ils furent ensemble, ils se demandèrent pour quoi faire, après tout. Alors il leur poussa tout à coup des guitares et ils formèrent du bruit. Au début, cela n'intéressait personne. »

The Beatles

« On s'aperçoit qu'on est devenu un spécialiste quand les choses dont on parle avec plaisir ennuient les autres. »

Gilbert Cesbron

Table des matières

1. ABREVIATIONS UTILISEES 6

2. INTRODUCTION 7

a. Vue générale de la transcription chez les eucaryotes 7
i. Assemblage du Pre-Initiation Complex (PIC) 7
ii. Promoter Clearance 7
iii. Elongation 7
iv. Terminaison 8

b. Le domaine carboxy terminal (CTD) de l'ARN polymérase II 8
i. Composition du CTD 8
ii. Evolution moléculaire du CTD 8
iii. Phosphorylation du CTD 9
iv. Pattern de phosphorylation du CTD 9
v. Interactions entre le CTD et les protéines s'y liant 10
vi. Les phosphatases du CTD 10
vii. La « structure » du CTD 11
viii. Le CTD et la méthylation des histones 11
ix. Un pattern surprenant de phosphorylation du CTD 13

c. Présentation des gènes choisis : ste11, pap1, csx1 et zfs1 14
i. ste11 14
ii. pap1 14
iii. csx1 14
iv. zfs1 15

3. OBJECTIFS DU MEMOIRE 16

4. RESULTATS 17

a. Etude du gène ste11 17
i. Efficience de croisement réduite dans les mutants S2A et *Δlsk1* 17
ii. Analyse de l'ARN Polymérase II sur le gène *ste11 via des expériences de ChIP* 18
1. En croissance végétative 18
2. En condition d'induction 19
iii. Différences d'expression de l'ARNm *ste11* en fonction des souches wt, S2A ou *Δlsk1* en condition d'induction 20
1. Monitoring du contenu en ADN des cellules en condition de carence azotée 21
2. Mesure de l'expression relative de l'ARNm de *ste11* via une q-RT PCR 21

b. Etude du gène pap1 22
i. Test de croissance dans des conditions de stress oxydatif 22
ii. Analyse de l'ARN Polymérase II sur le gène *pap1* via des expériences de ChIP 23
1. En absence de stress 23
2. En condition d'induction 24
iii. Différences d'expression de l'ARNm *pap1* en fonction de la souche wt, S2A ou *Δlsk1* 25

c. Etude des gènes csx1 et zfs1 26
i. Différences d'expression de l'ARNm de *csx1* et *zfs1* en fonction des souches wt, S2A ou *Δlsk1* 26

5. DISCUSSION 28

a. pap1, un faux positif ? 28

b. Régulation transcriptionnelle du gène pap1 29

c. zfs1 et csx1 sont-ils à placer sur le même plan que ste11 ou que pap1 ? 29

6. PERSPECTIVES 30

a. La sérine 2 phosphorylée en début de transcription : un mécanisme de régulation génétique pour une certaine catégorie de gènes ? 30

b. ste11, un cas particulier ou un mécanisme de régulation à plus large échelle ? 31

7. MATERIELS ET METHODES 32

a. Souches utilisées 32

b. Milieux de culture 32

c. Amorces utilisées lors des PCR 32

d. Coloration des spores à l'iode 33

e. Microscopie 33

f. Carence en azote 34

g. Induction au peroxyde d'hydrogène 34

h. FACS 34

i. ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) 34
i. Préparation de la chromatine 34
ii. Immunoprécipitation 35

j. Purification d'ADN 35

k. q-PCR 35

l. Extraction d'ARN 36

m. Purification d'ARN 36

n. RT-PCR 36

8. ANNEXE 37

9. BIBLIOGRAPHIE 38

1. Abréviations utilisées

Abréviation	Signification
AA	Acides Aminés
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNpn	Petits ARN Nucléaires
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
CDK	Cyclin Dependent Kinase
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
CID	CTD Interacting Domain
CTD	Domaine Carboxy-terminal de la sous-unité Rpb1 de la Polymérase II
DO	Densité Optique
HA	Hémagglutinine
IP	Immunoprécipitation
OC	Open Complex
ORF	Open Reading Frame
P3	Proline en position 3 du CTD
P6	Proline en position 6 du CTD
pb	paires de bases
PIC	Pre Initiation Complex
Pol II	ARN Polymérase ADN dépendante de type II
Pol IIa	ARN Polymérase ADN dépendante de type II dont le CTD n'est pas phosphorylé
Pol IIo	ARN Polymérase ADN dépendante de type II dont le CTD est hautement phosphorylé
S	Sérine
S2	Sérine en position 2 du domaine carboxy terminal de la sous-unité rpb1 de la Polymérase II
S2A	Sérine en position 2 du domaine carboxy terminal de la sous-unité rpb1 de la Polymérase II mutée en Alanine
S2P	Sérine en position 2 du domaine carboxy terminal de la sous-unité rpb1 de la Polymérase II présentant une phosphorylation
S5	Sérine en position 5 du domaine carboxy terminal de la sous-unité rpb1 de la Polymérase II
S5P	Sérine en position 5 du domaine carboxy terminal de la sous-unité rpb1 de la Polymérase II présentant une phosphorylation
TBP	TATA Binding Proteins
TF	Transcription Factor
WT	Wild Type

2. Introduction

a. Vue générale de la transcription chez les eucaryotes

La transcription de l'ADN en ARN est réalisée par l'ARN polymérase ADN dépendante. Chez les eucaryotes, il existe trois type de polymérases (Pol). La Pol I, responsable de la transcription des ARNr ; la Pol II impliquée dans la transcription de l'ARNm et la Pol III responsable principalement de la transcription des ARNt.
La transcription d'un gène par la Pol II est divisée en une série d'étapes. Ce processus peut être vu à la manière d'un cycle car, une fois la transcription d'un gène effectuée, Pol II peut être recyclée pour à nouveau servir dans la transcription d'un gène.
Ce cycle est composé des étapes suivantes : assemblage d'un complexe de pré-initiation (PIC), formation d'un complexe ouvert (OC), initiation, détachement du promoteur (promoter clearance), élongation du transcrit et enfin la terminaison[1].

i. Assemblage du Pre-Initiation Complex (PIC)

Dans un premier temps, les TATA Binding Proteins (TBP) reconnaissent la boîte TATA. Cette « boîte » est en fait une séquence nucléotidique comportant le consensus TATAAAA. Elle est située environ 25 paires de base (pb) en amont du site +1. Ce site est la première pb à être transcrite par Pol II. La présence de la TBP permet la liaison de facteurs de transcription généraux : reconnaissance du promoteur par TFIID ; reconnaissance du complexe promoteur TFIID par TFIIB ; recrutement d'un complexe TFIIF/Pol II et liaison de TFIIE et TFIIH pour terminer la formation du complexe de pré-initiation (PIC). TFIIA quant à lui peut joindre le complexe à n'importe quelle étape après la liaison de TFIID. Il permet de stabiliser le PIC[2].

ii. Promoter Clearance

Lorsque Pol II est recrutée sur le promoteur, son CTD (voir ci-dessous) est dans un état non phosphorylé. Elle est retenue sur le promoteur par le médiateur qui assure un lien entre les protéines du PIC et le CTD de Pol II. Il s'agit vraisemblablement d'un checkpoint avant d'engager la transcription. La phosphorylation du CTD par la kinase associée au TFIIH est augmentée d'un facteur 100 par le médiateur. Il semblerait que les charges négatives portées par les phosphates du CTD permettent une dissociation du promoteur afin de rentrer dans la phase d'élongation[3]. Ce phénomène porte le nom de « promoter clearance ».

iii. Elongation

Une fois Pol II libérée du promoteur, elle transcrit l'ADN en ARN. Au cours de cette étape, le CTD est phosphorylé, ce qui permet le recrutement de plusieurs machineries de maturation des messagers, cet aspect sera détaillé dans le point traitant du domaine carboxy terminal [1].

iv. Terminaison

Une fois passé le codon STOP de la phase ouverte de lecture (ORF), il existe au sein de l'ADN une région renfermant des éléments terminateurs responsables de la dissociation du complexe ADN-ARN-Pol II. Le CTD de Pol II est ensuite déphosphorylé pour pouvoir être réutilisé dans un nouveau cycle de transcription. L'ARN produit est exporté vers le cytoplasme pour permettre sa traduction[1].

b. Le domaine carboxy terminal (CTD) de l'ARN polymérase II

i. Composition du CTD

Des évidences moléculaires indiquent que les eucaryotes ont divergé des procaryotes il y a 2.5 milliards d'années[4]. Ceci implique que les ARN Polymérases des eucaryotes et des procaryotes proviennent d'un ancêtre commun. Bien que les séquences catalytiques présentent des régions extrêmement conservées, les régions régulatrices ont, elles, beaucoup évolué. En effet, le Carboxy Terminal Domain (CTD) n'est pas présent chez les procaryotes ainsi que dans les ARN Polymérase I et III des eucaryotes. C'est la plus grande sous-unité de l'ARN Polymérase II (Pol II), Rpb1, qui porte le CTD. Celui-ci consiste en une répétition d'un motif de 7 acides aminés (AA): $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$[5]. Le nombre de ces répétitions varie d'une espèce à l'autre : les protozoaires en possèdent 15[6], 26 pour la levure et 52 pour l'humain[5]. Sur les 7 AA de cette séquence, 5 sont phosphorylables[7]. Une phosphorylation massive du CTD est d'ailleurs observée *in vivo*.
Les deux AA non phosphorylables sont des Prolines (P3 et P6). Si ces AA servaient uniquement de linker, d'autres, tels que des Alanines, auraient pu prendre leur place. Cependant, ces P3 et P6 sont conservées sur 51 des 52 répétitions du CTD humain, la forme non conservée étant la dernière répétition[8]. Ces AA ne sont pas anodins car ils peuvent passer d'orientation *cis* à *trans* grâce à une prolyl isomérase. En combinaison avec les phosphorylations des S2 et S5, cela mène à 16 le nombre de possibilités différentes de configurations pouvant être prises par le CTD. De plus, les répétitions du CTD peuvent prendre des conformations différentes les unes des autres ce qui augmente encore les possibilités de la combinatoire[9].

ii. Evolution moléculaire du CTD

Il existe trois hypothèses pour expliquer l'origine du CTD.
Son origine se retrouve soit dans d'anciennes duplications d'une région du génome (avant la différenciation des espèces), soit d'origine indépendante, soit d'une amplification récente (après la différenciation des espèces). Dans les deux premier cas, le biais des codons devrait être différent entre les répétitions du CTD alors que dans le dernier cas, il doit être semblable. La dernière hypothèse semble valide. De plus, le biais utilisé d'un organisme à l'autre est différent. Cette découverte suggère que la multiplication des répétitions a eu lieu de façon indépendante au sein des différents organismes[10].

iii. Phosphorylation du CTD

Les études de plusieurs laboratoires ont établi que la phosphorylation du CTD régule le recrutement spécifique de protéines impliquées dans la maturation des ARNm au cours de la transcription[11-13].
Les sites de phosphorylation les mieux caractérisés au sein de répétitions du CTD sont la Sérine 2 (S2) et la Sérine 5 (S5)[14]. La Sérine 7 ne fut que récemment décrite comme impliquée dans la maturation de petits ARN nucléaires (ARNpn) transcrits par la Pol II[6].
Les résidus S2 et S5 sont la cible de différentes kinases appartenant à la famille des Cyclin Dependent Kinase (CDK). Chez la levure de fission, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), la kinase essentielle Mcs6 (orthologue de CDK7) phosphoryle S5. Lsk1, non essentielle, phosphoryle S2[15]. Une autre kinase dénommée Cdk9 phosphoryle *in vitro*, S2 et S5. Cette kinase, bien qu'apparentée à Lsk1 possède un rôle moins clair *in vivo*[16]. La **Fig. 1** illustre ce cycle.

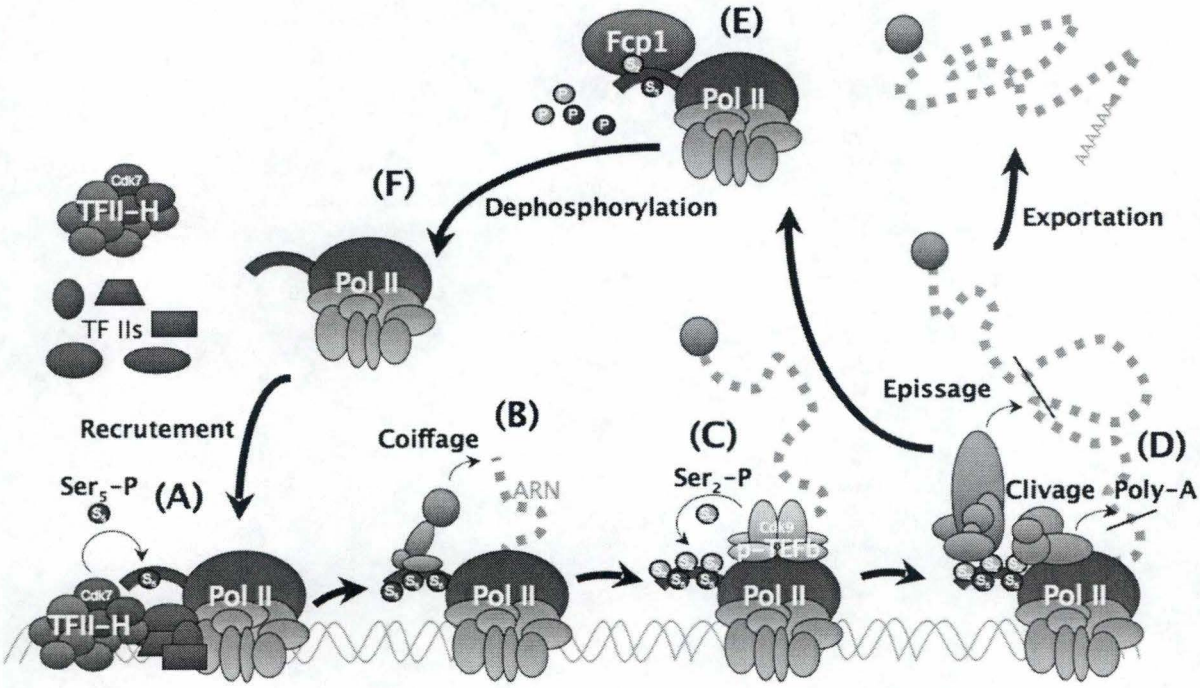

Figure 1 Cycle de Pol II au cours de la transcription et phosphorylation du CTD (modifié à partir de [8]).

iv. Pattern de phosphorylation du CTD

Le pattern de phosphorylation observé au cours de la transcription **(Fig. 2)** est habituellement le suivant[12] : Pol II est recrutée sur le promoteur. Elle est alors dans un état non phosphorylé. Ensuite S5 est phosphorylée par CDK7. Cette phosphorylation permet au CTD de recruter les enzymes de capping qui à leur tour autorisent le recrutement de la kinase de S2 au cours de la phase d'élongation. Cette modification augmente l'affinité du CTD pour les machineries d'épissage et de polyadénylation de l'ARNm.

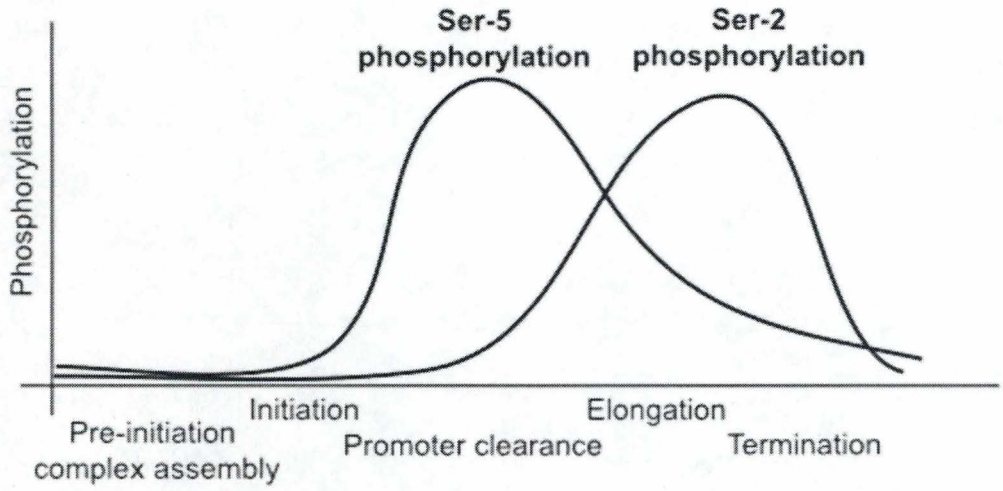

Figure 2 Etat de phosphorylation du CTD de Rbp1 durant le cycle de la transcription[1].

Le fait que chez *S. pombe*, la kinase de la sérine 2, Lsk1, ne soit pas essentielle[17] supporte l'hypothèse selon laquelle la phosphorylation de S2 n'est pas indispensable pour le recrutement des machineries d'épissage et de polyadénylation et que ces machineries puissent être recrutées, peut-être moins efficacement, indépendamment du CTD.

v. Interactions entre le CTD et les protéines s'y liant

De nombreuses protéines se lient à une forme phosphorylée du CTD. Les protéines interagissant avec le CTD portent un CTD Interacting Domain (CID). Quand le CTD est phosphorylé, il permet l'interaction CTD-CID. Il semblerait que les phosphorylations n'aient pas de contact physique direct avec le CID mais bien une action indirecte. Dans la répétition $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$, la partie $S_2P_3T_4S_5$ a tendance à former des hélices bêta. La S2P permet de stabiliser cette hélice via un pont hydrogène supplémentaire. La S5P permet quant à elle d'étendre le CTD afin de favoriser l'interaction avec les CID des protéines se liant sur le CTD[18]. Une autre hypothèse propose que les phosphorylations des S2 et S5 agissent comme des ancres électrostatiques sur les protéines interagissant avec le CTD[9].

vi. Les phosphatases du CTD

A la fin de la transcription d'un gène, le CTD est dans un état hautement phosphorylé (RNAPIIo). Mais lorsque Pol II se détache de l'ADN, elle doit être « recyclée » afin de pouvoir à nouveau servir dans un cycle de transcription. Cette étape requiert l'action d'une ou plusieurs phosphatases pour passer d'un état phosphorylé (Pol IIo) à un non phosphorylé (Pol IIa)[19]. Fcp1 possède une activité phosphatase à la fois sur S2P et S5P. Toutefois son activité est 10 fois plus élevée en faveur de S2P[20]. Il existe donc probablement une deuxième phosphatase avec une préférence pour la déphosphorylation de S5P. La protéine Ssu72 a été découverte comme faisant non seulement partie du complexe de clivage et de polyadénylation

de l'ADN mais également comme possédant une activité de type phosphatase avec une préférence de site pour S5P[21].
Comment se fait-il alors que le CTD ne soit pas directement déphosphorylé après l'action de ses kinases ? La liaison de Pol II à l'ADN diminue de 5 fois l'efficacité des phosphatases sur son CTD. En effet, lors de l'élongation, un changement de la conformation de Pol II serait à la base du recrutement des phosphatases du CTD [22].

vii. La « structure » du CTD

Pol II est constituée de 12 sous-unités dont 10 ont une structure connue. Les seules régions pour lesquelles l'étude de la structure montre des incertitudes sont des régions variables, régions exposées et le CTD[23]. L'incertitude de structure du CTD résulte de sa grande flexibilité bien qu'il montre une préférence pour la conformation de type brins bêta[24]. Le CTD est relié à Pol II via un linker mesurant 250 Å lorsqu'il est à l'état étendu. Le CTD, quant à lui, dans le même état mesure 650 Å. Pol II possède un diamètre de 150 Å , ce qui offre la possibilité théorique au CTD d'atteindre n'importe quel endroit à proximité du CTD[24]. La **Fig. 3** illustre ce phénomène.

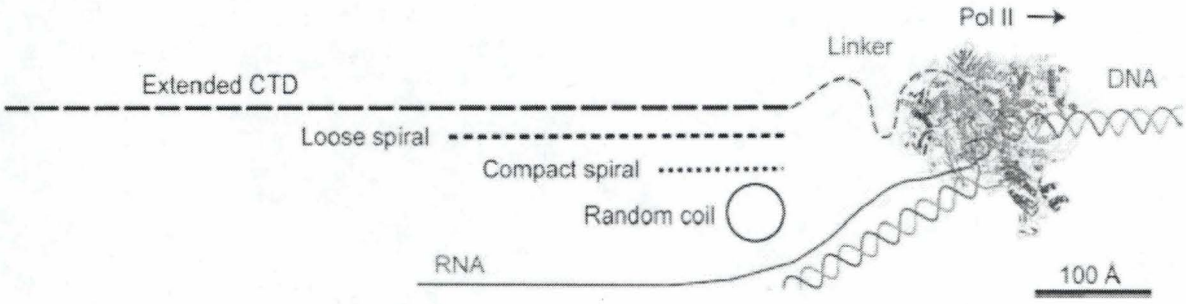

Figure 3 ARN pol II et représentation des différentes formes du CTD (modifié à partir de [24]).

Le sillon par lequel l'ARN sort de Pol II a été identifié. Il est situé à proximité du CTD. Cette proximité permettrait aux enzymes de modification de l'ARN d'être présentes au lieu précis où leur action doit être exercée. Par exemple, le capping a lieu après la transcription de 25 nt. Cela permet à l'extrémité 5' de l'ARN d'être en contact avec le CTD et les machineries de capping qui y sont présentes à ce moment de la transcription[23].

viii. Le CTD et la méthylation des histones

Au sein du génome, l'ADN est empaqueté autour des histones H2A, H2B, H3 et H4 pour former la chromatine. Les histones s'assemblent en homodimère, ce qui résulte en une structure octamérique fortement compactée nommée nucléosome. Depuis plusieurs années, il apparaît que les modifications en *trans* des histones jouent un rôle au niveau de la transcription. En effet, selon les modifications qui touchent les histones, la chromatine peut prendre une conformation plus resserrée ou plus lâche. Ceci donne lieu respectivement à de l'hétéro- et euchromatine. La première, étant difficilement accessible aux machineries de transcription, est peu sujette à la transcription et inversement pour l'euchromatine. De

nombreux types de modifications touchent les histones : la phosphorylation, la méthylation, l'acétylation ou la sumoylation. Certaines modifications ont un effet positif sur la transcription comme la méthylation de la lysine 36 sur l'histone H3 (H3K36 Me) alors que d'autres modifications ont un effet négatif : la méthylation de H3K9[25].
Il existe une série d'enzymes responsables de ces modifications. Set1 et Set2 en sont deux exemples. Elles greffent respectivement un troisième groupement méthyl sur H3K4[26] et un méthyl sur H3K36[27]. Ces deux enzymes possèdent la particularité d'être recrutées par le CTD phospshorylé. Set1 est recrutée par un CTD de type S5P[28] alors que Set2 l'est par un CTD de type S2P[29]. Il existe donc un lien entre le CTD et les histones.
Dans une souche délétée pour la méthyltransférase Set2, des problèmes lors de la phase d'élongation sont observés[27]. Ils peuvent être dus à deux choses. D'une part, des problèmes dans l'organisation des complexes de coiffage, épissage et polyadénylation sont possibles. D'autre part, la chromatine n'est plus maintenue dans un état aussi ouvert que lorsque la modification H3K36 Me est présente[30].
Il est important de noter que la modification H3K36 ne se retrouve pas sur tous les gènes : elle est gène spécifique[29].
D'une manière assez étonnante, lorsque cette modification d'histone est présente, elle l'est tout au long du gène. Ceci est surprenant puisque Set2 est recrutée par un CTD S2P, or nous avons vu que S2P n'augmente qu'en phase d'élongation[13]. Une explication proposée par certains auteurs est que même un niveau faible de S2P est suffisant pour recruter Set2[29]. La présence de H3K36 Me en régions promotrices est donc possible.

ix. Un pattern surprenant de phosphorylation du CTD

Dans notre laboratoire, des études « ChIP-on-chip » à l'échelle du génome de *S. pombe* ont été réalisées[31] pour établir la distribution de Pol II phosphorylée sur S2 ou S5, ainsi que celle des kinases du CTD, notamment Lsk1 qui phosphoryle S2. La **Fig. 4** donne une représentation graphique locale de la distribution de Lsk1 et S2P.

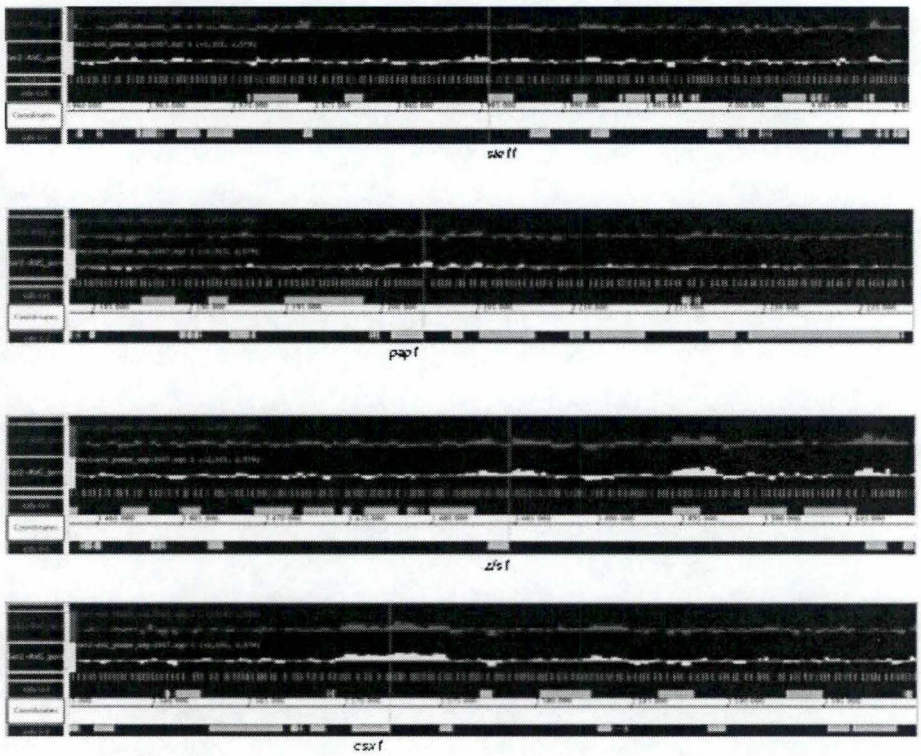

Figure 4 : Représentation graphique des profils Lsk1 (rouge) et S2P (jaune) pour les loci contenant ste11, pap1, zfs1 et csx1. Les ORFs sont représentées sur les deux brins (boites turquoises), les barres verticales indiquent les sondes utilisées en ChIP-on-chip.

De façon inattendue, cette étude révèle que S2P et Lsk1 sont associées à un nombre de loci nettement réduit par rapport à S5P et sa kinase Mcs6. Cette découverte pose la question suivante : S2P occupe-t-elle un rôle global au sein de la transcription ou bien un rôle spécifique lors de la transcription de certains gènes ?
De plus, un groupe d'environ 115 gènes présentent un profil inattendu pour S2P et Lsk1 qui sont enrichis dans les régions 5' UTR (untranslated regions), ce qui contraste avec ce qui est habituellement observé[12].
Une analyse de ces 115 gènes par le programme AmiGO® (Gene Ontology)[32], qui permet de réaliser des regroupements fonctionnels dans un ensemble de gènes, indique que les catégories « régulations biologiques », « régulation de l'expression des gènes » et « transcription spécifique du promoteur par la Pol II » sont enrichies dans ce groupe. L'ensemble des 115 gènes est présenté en annexe **(Tab. 1)**.

Au cours de ce travail, nous avons choisi d'étudier ce groupe et d'analyser si S2P possède une fonction biologique spécifique pour ces gènes. Au sein des 115 gènes, nous nous sommes

d'abord concentrés sur *ste11* et *pap1*. Ce choix est principalement motivé par la bonne connaissance des fonctions des protéines encodées par ces deux gènes.
Deux autres gènes, *csx1* et *zfs1*, ont fait l'objet d'une étude préliminaire à la fin du travail.

c. Présentation des gènes choisis : ste11, pap1, csx1 et zfs1

i. ste11

Ste11 est le facteur de transcription responsable de la différentiation sexuelle de *S. pombe*. Il est induit par une carence en azote qui occasionne une diminution de la concentration en AMPc[33], qui à son tour entraîne l'induction transcriptionnelle de *ste11* et un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Le facteur de transcription Ste11 active la transcription d'environ 80 gènes responsables de la conjugaison entre haploïdes de types sexuels opposés et des changements physiologiques liés au processus méiotique.
Parallèlement à l'induction transcriptionnelle, Ste11 est aussi régulé négativement par la kinase Cdc2. En phase G1, l'activité de Cdc2 est faible, ce qui augmente l'activité de Ste11. Dans les autres phases du cycle, Cdc2 est active, ce qui entraîne la phosphorylation et l'inactivation de Ste11 [34].

ii. pap1

Pap1 est un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress oxydatif. Il partage ce rôle avec Atf1. Le premier est impliqué dans une réponse à de faibles concentrations en agents oxydants : typiquement 0.2 mM. A l'inverse le second joue un rôle dans la réponse à de hautes concentrations : 1.0 mM[35].
Le mécanisme de régulation de Pap1 est basé sur son exportation constante du noyau vers le cytoplasme via l'exportine Crm1, lorsque la cellule ne subit pas de stress oxydatif[36]. En fonction de la concentration en H_2O_2, un switch moléculaire s'effectue via Tpx1, une thioredoxine peroxydase. A une concentration en peroxyde d'hydrogène de 0.2 mM, Tpx1 n'est que faiblement oxydée : elle conserve alors sa pleine activité. Ceci lui permet d'oxyder Pap1 avec pour effet l'inhibition de l'interaction entre Pap1 et Crm1 et l'accumulation nucléaire de Pap1. A de fortes concentrations Tpx1 perd son activité et ne peut donc plus oxyder Pap1. Il sera alors exporté du noyau de manière similaire qu'en conditions non oxydatives[37]. L'induction de *pap1* au niveau transcriptionnel est très peu connue[38].

iii. csx1

Csx1 est également une protéine cruciale dans la réponse au stress oxydatif. Son rôle est de s'associer et de stabiliser l'ARNm d'*atf1*[39]. Ceci permet une traduction très efficace du messager *atf1*. La concentration optimale pour Csx1 est de 1.0 mM. Ceci est logique puisqu'il interagit l'ARNm de *atf1* qui est préférentiellement activé par rapport à Pap1 à cette concentration.

iv. zfs1

Sa fonction est d'optimiser l'action des phéromones de mating. Son expression augmente de trois fois en condition de carence azotée[40]. Cette protéine contient des domaines doigt de zinc. Elle est capable de lier certains ARNm riches en régions AU. La liaison déstabilise ces derniers et accélère leur dégradation[41].

3. Objectifs du mémoire

Comme annoncé ci-dessus, S2P possède une distribution inhabituelle sur 115 gènes de *S. pombe*. L'objectif de ce mémoire est donc d'étudier la portée biologique de ce phénomène plus spécifiquement sur les 4 gènes *ste11*, *pap1*, *csx1* et *zfs1*.
Pour les deux premiers, une étude en parallèle sera menée. Tout d'abord, des souches dont S2 ne peut plus être phosphorylée seront testées dans des conditions qui entrainent l'induction de ces gènes : carence azotée et stress oxydatif pour *ste11* et *pap1* respectivement. L'importance biologique de S2P sera déduite du phénotype observé. Dans l'étude de *ste11*, la capacité à former des spores sera observée. Dans l'étude de *pap1*, la résistance au stress oxydatif sera testée. Ensuite, les profils ChIP de ces deux gènes seront testés en condition d'induction. Pour terminer, la quantité d'ARNm sera mesurée en condition d'induction dans des souches sauvages et dans des souches dont la phosphorylation de S2 est empêchée.
Enfin, une étude pilote sur *csx1* et *zfs1* sera réalisée. Elle consistera en la mesure de la quantité relative des ARNm de ces gènes dans des conditions d'induction.
La visée de ce mémoire est de conclure si ce pattern particulier de S2P est relevant pour la transcription des gènes *ste11*, *pap1*, *csx1* et *zfs1*.

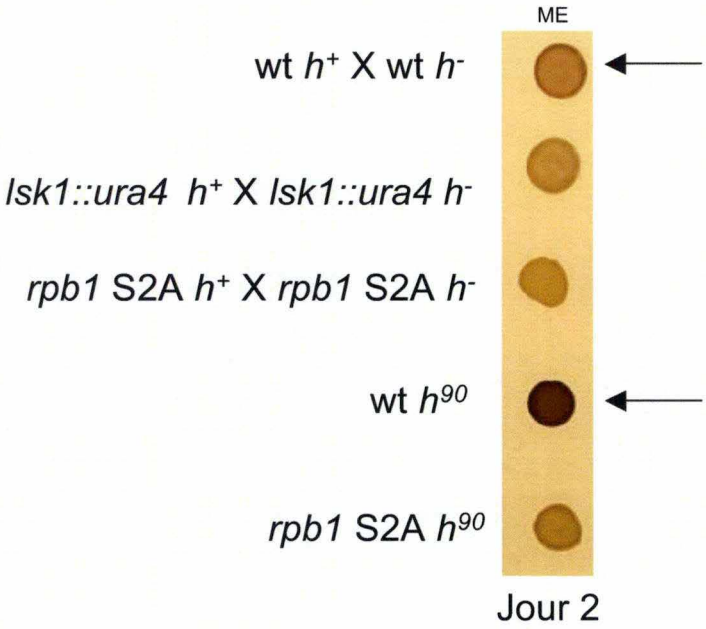

Figure 5 : Test de sporulation sur ME (milieu pauvre en azote) de différentes souches de S. pombe.

Du haut vers le bas, croisements réalisés entre les souches suivantes : wt h^+ (19) et wt h^- (20); lsk1::ura4 h^+ (468) et lsk1::ura4 h^- (461); rpb1 S2A h^+ (562) et rpb1 S2A h^- (552); auto-croisement de wt h^{90} (568); auto-croisement de rpb1 S2A h^{90} (596). Une couleur plus sombre après exposition à l'iode résulte de la présence de spores et indique donc qu'il y a eu différentiation sexuelle. La coloration à l'iode est réalisée après 2 jours. Une flèche noire indique les croisements dans lesquels des tétrades sont présentes.

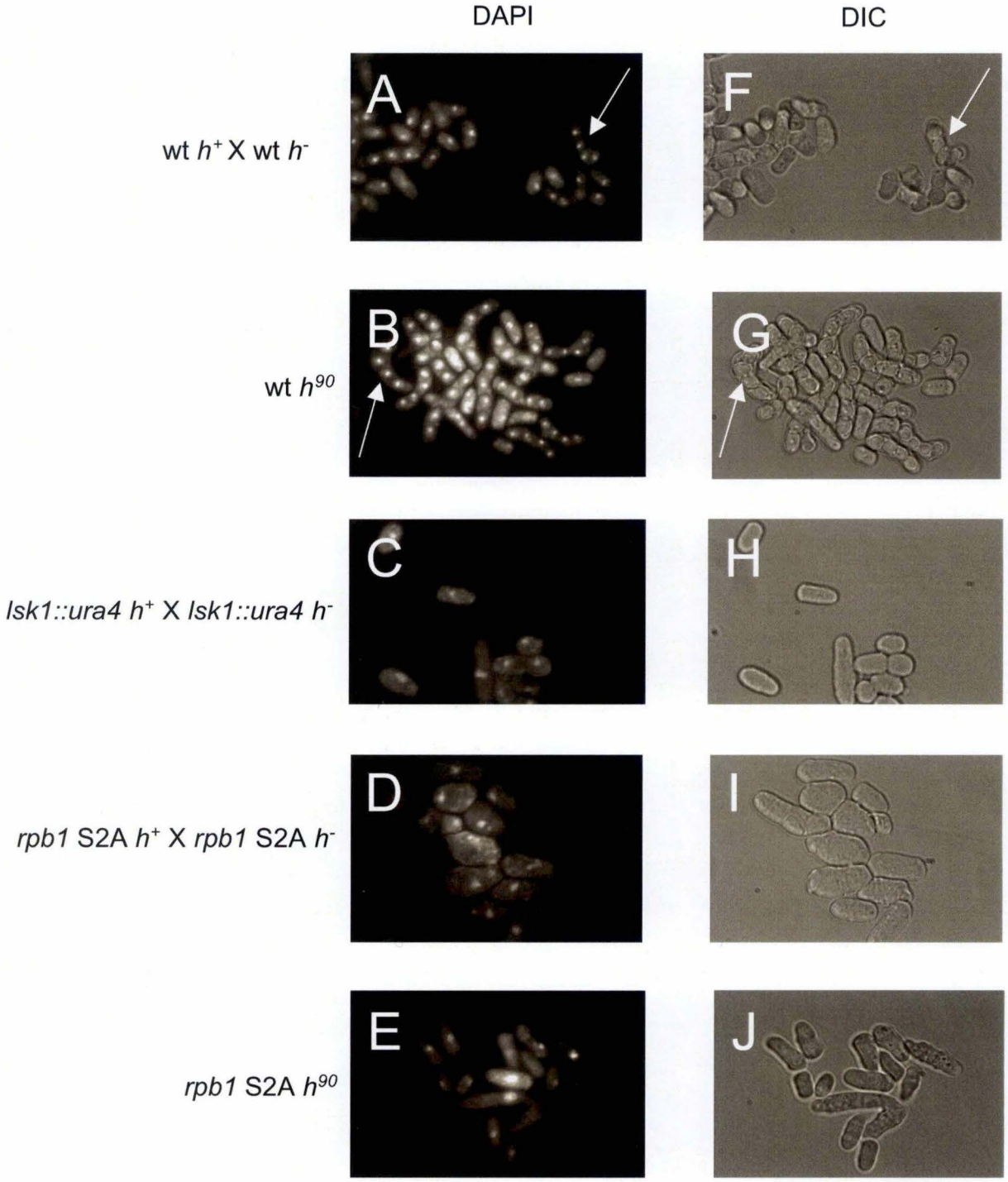

Figure 6 : Test de sporulation de souches de S. pombe observé au microscope (grossissement 100X) après coloration au DAPI.

A-E sont observées avec un filtre DAPI. F-J sont observées avec un filtre DIC. (A;F) Croisement entre les souches wt h^+ (19) et wt h^- (20). (B;G) Auto-croisement de la souche wt h^{90} (568). (C;H) Croisement entre les souches lsk1::ura4 h^+ (468) et lsk1::ura4 h^- (461). (D;I) Croisement entre les souches rpb1 S2A h^+ (562) et rpb1 (S2A) h^- (552). (E;J) Auto-croisement de la souche rpb1 S2A h^{90} (569).

Des tétrades sont présentes en A;F et B;G. Les flèches blanches en indiquent un exemple.

4. Résultats

Les gènes *ste11* et *pap1* seront étudiés de manière similaire de façon à pouvoir établir un parallélisme entre les deux. Par la suite, une expérience pilote au sujet de *csx1* et *zfs1* sera commentée.

a. Etude du gène ste11

i. Efficience de croisement réduite dans les mutants S2A et *Δlsk1*

Comme décrit lors de l'introduction, chez *S. pombe*, le gène *ste11* est le régulateur central de la différenciation sexuelle, ce qui fournit un rapporteur clair de son induction. En effet, la capacité des levures à entrer en méiose pour former des spores est un marqueur facile à suivre dans une souche sauvage ou lorsque la phosphorylation de S2 est perturbée.

Afin d'interférer avec la phosphorylation de S2, deux types de mutants, en *cis* ou en *trans*, ont été créés au laboratoire. Dans le premier cas, toutes les S2 du CTD sont mutées en alanine, un résidu non phosphorylable. Ce mutant sera communément appelé S2A.
Dans le second cas, le gène codant pour la kinase Lsk1 qui phosphoryle la S2 du CTD est délété. Fonctionnellement, on attend que ces deux mutants se comportent de façon identique.
Des conditions de carence en azote induisent la différentiation sexuelle : des cellules haploïdes de types sexuels opposés fusionnent pour former un diploïde qui entre rapidement en méiose pour générer quatre haploïdes ou spores. Un test phénotypique de sporulation **(Fig. 5)** peut être facilement réalisé en présence de vapeurs d'iode qui donnent une couleur sombre aux spores. Un croisement entre cellules de type sexuel opposé peut être réalisé à partir d'une population homothalique (dénommée h^{90}) ou à partir de deux populations hétérothaliques (dénommée h^{+}et h^{-}). La différence réside dans le fait qu'une population h^{90} est formée de cellules qui peuvent changer de type sexuel : les deux types s'y trouvant représentés à fréquence similaire, alors que les cellules de populations h^{+}ou h^{-} restent figées dans leur identité sexuelle[42].
Les souches contrôles présentées à la **fig. 5** montrent une coloration en présence d'iode. Les souches pour lesquelles la phosphorylation de la S2 est abolie (S2A et *Δlsk1*) montrent une coloration très atténuée, indiquant un nombre réduit, ou l'absence de spores. Cette expérience établit également une différence d'efficience entre les croisements homo- et hétérothalique. En effet, le croisement homothalique (h^{90}) génère une coloration beaucoup plus sombre qui témoigne de la présence d'un plus grand nombre de spores.
Cette expérience indique que l'absence de phosphorylation de la S2 sur le CTD affecte fortement la différentiation sexuelle et la fertilité.

Afin de confirmer ces résultats, les cellules provenant des différents croisements sur ME sont observées au deuxième jour d'incubation grâce à un microscope à fluorescence **(Fig. 6)** après coloration au DAPI.

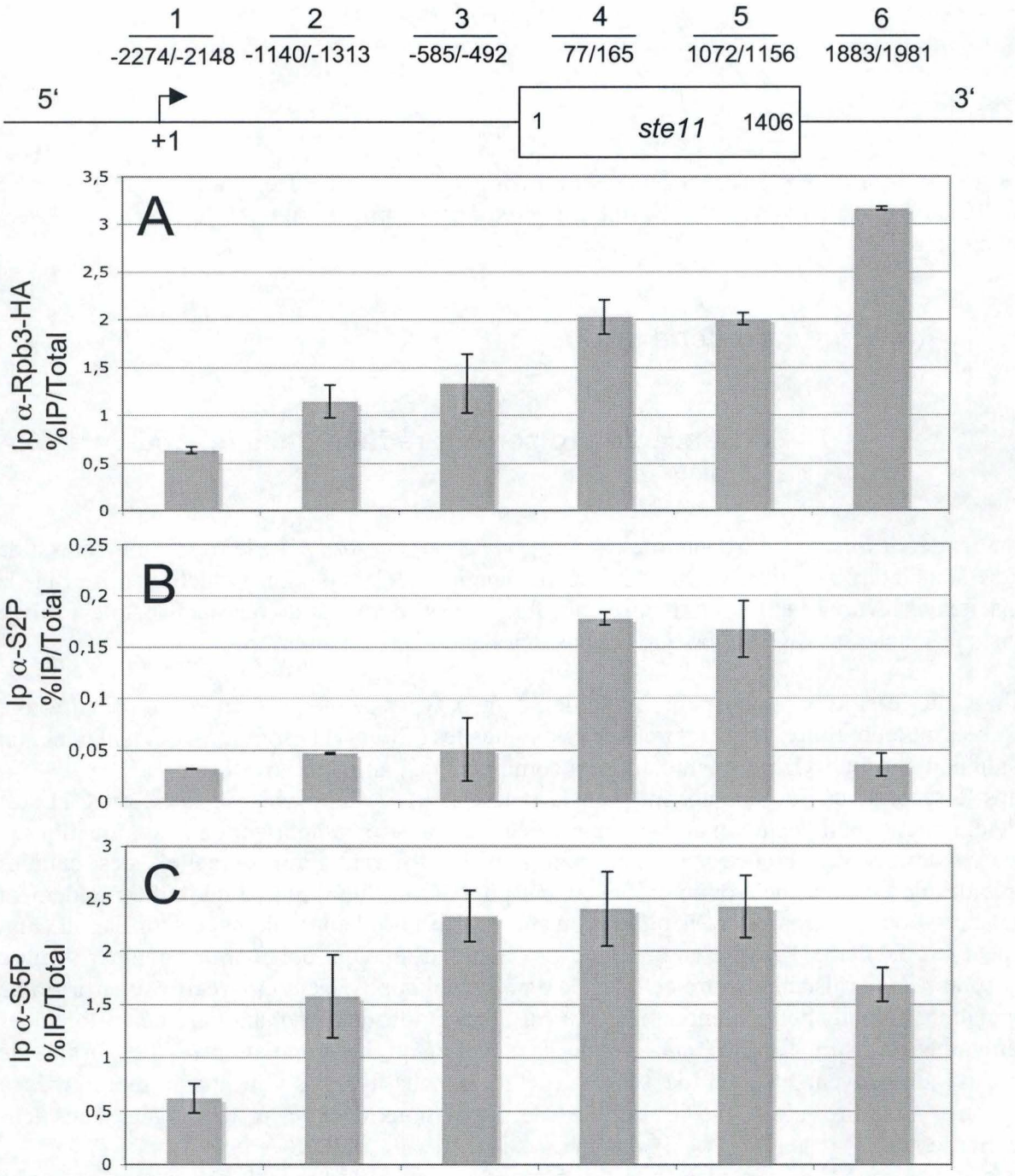

Figure 7 : ChIP mettant en évidence la distribution de l'ARN Pol II le long du l'unité de transcription ste11 dans une souche rpb3-3HA(536).

Les positions des amplicons utilisés sont notées de façon relative à la première pb de l'ATG de ste11 et de 1 à 6. Le site d'initiation de la transcription est également indiqué et ce, d'après la litérature. Les barres des histogrammes réfèrent à une moyenne de duplicats biologiques. Les anticorps utilisés sont anti-HA (A), anti-S2P (B) et anti-S5P (C).

Les croisements wt **(Fig. 6 A-B et F-G)** montrent la présence de tétrades. Notons que leur concentration est plus élevée dans la souche wt h^{90} que dans le croisement wt h^{+}/h^{-}. Ceci est en adéquation avec les observations faites après la coloration à l'iode. Les souches dont le CTD est non-phosphorylable sur la S2 ne montrent pas de spores **(Fig. 6 C-E et H-J)**. Notons cependant que la présence de spores a été détectée dans le mutant *Δlsk1*. Toutefois, ces spores ont une concentration nettement inférieure à celle du croisement wt h^{+}/h^{-}. Ce résultat n'est pas présenté dans les figures.

Les observations au microscope à fluorescence **(Fig. 6)** sont en adéquation avec les résultats obtenus dans la **fig. 5**. Nous concluons qu'en l'absence de phosphorylation de la S2, les souches sont stériles ou du moins leur capacité à former des spores est fortement réduite.

ii. Analyse de l'ARN Polymérase II sur le gène *ste11 via des expériences de ChIP*

1. En croissance végétative

Afin de confirmer les résultats obtenus lors de l'expérience de ChIP-on-chip, il était informatif de d'abord réaliser un ChIP en conditions de croissance végétative **(Fig. 7)**, c'est-à-dire en l'absence de différentiation sexuelle. Cette étude d'un seul gène offre l'avantage de présenter une plus grande précision puisque la densité des amplicons peut être modulée à souhait.

La distribution chromatidienne de l'ARN Polymérase II le long du locus *ste11* a d'abord été observée **(Fig. 7 A)**. Elle correspond à ce qui est communément décrit dans la littérature, et croît de façon constante depuis la région 5' UTR jusqu'en 3' UTR. L'abondance plus marquée de Pol II en fin de transcription indique un ralentissement de la transcription qui peut être lié aux étapes de terminaison. Ce type de profil est communément observé en ChIP pour la majorité des gènes. Lors d'un ChIP, la première étape clef est la fixation des facteurs interagissant avec l'ADN de façon covalente. Les régions où la Pol II est plus lente présentent donc des niveaux d'enrichissement plus élevés. Nous sommes ici en présence du même phénomène que lorsqu'une photographie d'un objet mobile est prise avec un long temps de pause. Les endroits où l'objet en question est plus lent le montreront de façon plus forte que ceux où il est plus rapide.

Nous avons, dans un second temps, établi le profil de la S2P sur le locus *ste11* **(Fig. 7 B)**. Plusieurs informations sont à tirer de cette figure. La première est que de la S2 est déjà phosphorylée sur la région 5' UTR du gène *ste11*. Il pourrait être postulé que ce pourcentage d'immunoprécipitation reflète un niveau basal rémanent au sein de tout le génome de *S. pombe* et ce même dans les déserts géniques, ces régions non transcrites qui ne possèdent que très peu ou pas de Pol II. Pour explorer cette possibilité, une région intergénique connue pour son absence de Pol II a été testée et les niveaux de S2P obtenus pour cette région sont nettement plus faibles que les niveaux présentés ici en 5' UTR (donnée du laboratoire). On peut donc affirmer que la S2P est présente en 5' UTR. Le niveau de S2P augmente au niveau de l'ORF, mais il est déjà très élevé au niveau de l'amplicon 4, en tout début d'ORF, ce qui est remarquable puisque les niveaux de S2P sont traditionnellement plus élevés en fin de transcription.

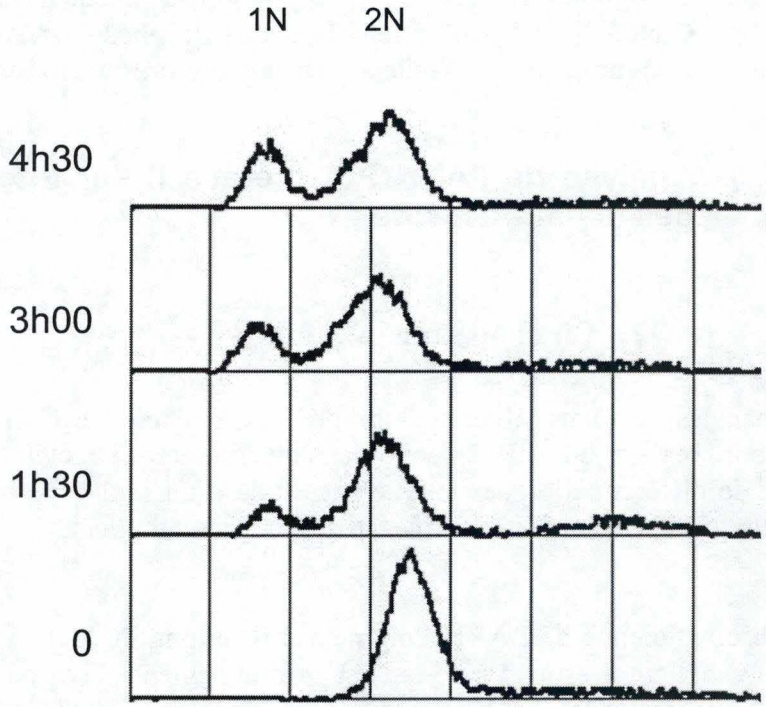

Figure 8 : Analyse au FACS du contenu en ADN de la souche rpb3-3HA (536) au cours d'une carence azotée.

La carence azotée est induite au temps 0. Les différents échantillons sont récoltés aux temps indiqués. La popultation 1N est représentée par le pic de gauche tandis que la population 2N est représentée par le pic de droite.

La distribution de la S5P le long de *ste11* a également été analysée **(Fig. 7 C).** Il est particulier en ce sens que la S5P est classiquement enrichie au niveau du promoteur, ce qu'on n'observe pas ici. Au contraire, le signal est plus important au niveau de l'ORF. Il faut rappeler que ces expériences sont réalisées en croissance végétative, dans des conditions où la transcription de *ste11* n'est pas induite, ce qui pourrait expliquer cette observation.
Nous avons ensuite comparé ces résultats avec ceux obtenus en condition de carence en azote.

2. En condition d'induction

Afin de voir si l'induction de *ste11* entraîne une modification dans le profil d'association de la Pol II et de ses formes phosphorylées, les cellules sont cultivées en milieu minimum (EMM) puis filtrées et replacées dans le même milieu dépourvu d'azote (EMM-N). Des échantillons sont prélevés à différents temps.
Lors de la phase exponentielle, *S. pombe* est majoritairement en phase G2. Cette phase occupe la plus grande partie du cycle cellulaire dans cet organisme. Lors d'une carence en azote, les cellules s'arrêtent graduellement en phase G1. Cette transition peut être monitorée grâce à une analyse FACS d'un échantillon contrôle de cellules provenant de chacun des temps pris au cours d'un « time course ».

C'est ce qui a été montré à la **fig. 8**. L'axe des abscisses représente le contenu en ADN, et celui des ordonnées, le temps. Des échantillons sont prélevés aux temps 0, 1h30, 3h00 et 4h30 après passage en milieu pauvre en azote. Au temps 0, une seule population cellulaire est présente et correspond à la population non synchronisée dont la majorité de ces cellules sont en phase G2 (postréplication : contenu 2N). Après 1h30, une sous-population de contenu deux fois moindre (1N) apparaît. Elle correspond aux cellules qui ont été bloquées en G1 par la carence en azote, et augmente avec le temps.
Nous concluons que le passage de milieu EMM à un milieu EMM-N est efficace pour établir progressivement une population de contenu en ADN équivalent à 1N, compétente pour la différentiation sexuelle.

Les conditions expérimentales établies, plusieurs expériences de ChIP ont été réalisées **(Fig. 9)**. Le nombre d'amplicons utilisé a dû être diminué car le nombre de puits présents par plaque ne permettait pas l'analyse de 4 temps avec 6 amplicons différents. Les amplicons utilisés vont donc du numéro 3 (situé en 5' UTR de l'ORF de *ste11*) à l'amplicon 6 (situé en 3' UTR de l'ORF de *ste11*).
Comme précédemment, le profil d'association de la Pol II le long de *ste11* a d'abord été observé **(Fig. 9 A)**. Pour rappel, à la différence de la **Fig. 7 A**, le milieu de départ n'est plus du milieu riche mais un milieu minimum défini et l'évolution est suivie au cours du temps dans ce même milieu mais dépourvu d'azote.
D'une manière générale, l'observation principale est que, après 1h30 et 3h00, la présence de la Pol II augmente le long du locus de *ste11* pour rediminuer après 4h30.
L'induction transcriptionnelle de *ste11* pourrait donc impliquer une augmentation locale de la présence de l'ARN Polymérase II. Toutefois, cette augmentation reste assez faible à la vue des hauts niveaux de transcrits observés (voir plus loin). Dans un second temps, nous avons établi le profil de la distribution de Lsk1, la kinase de la S2 **(Fig. 9 B)**. Dans ce cas, une induction nette est visible au temps 1h30. Bien que les niveaux maximaux soient atteints au sein de l'ORF, une augmentations est également évidente sur le 5' UTR, attestant du recrutement de la kinase sur cette région. Ce profil est inattendu du fait que la

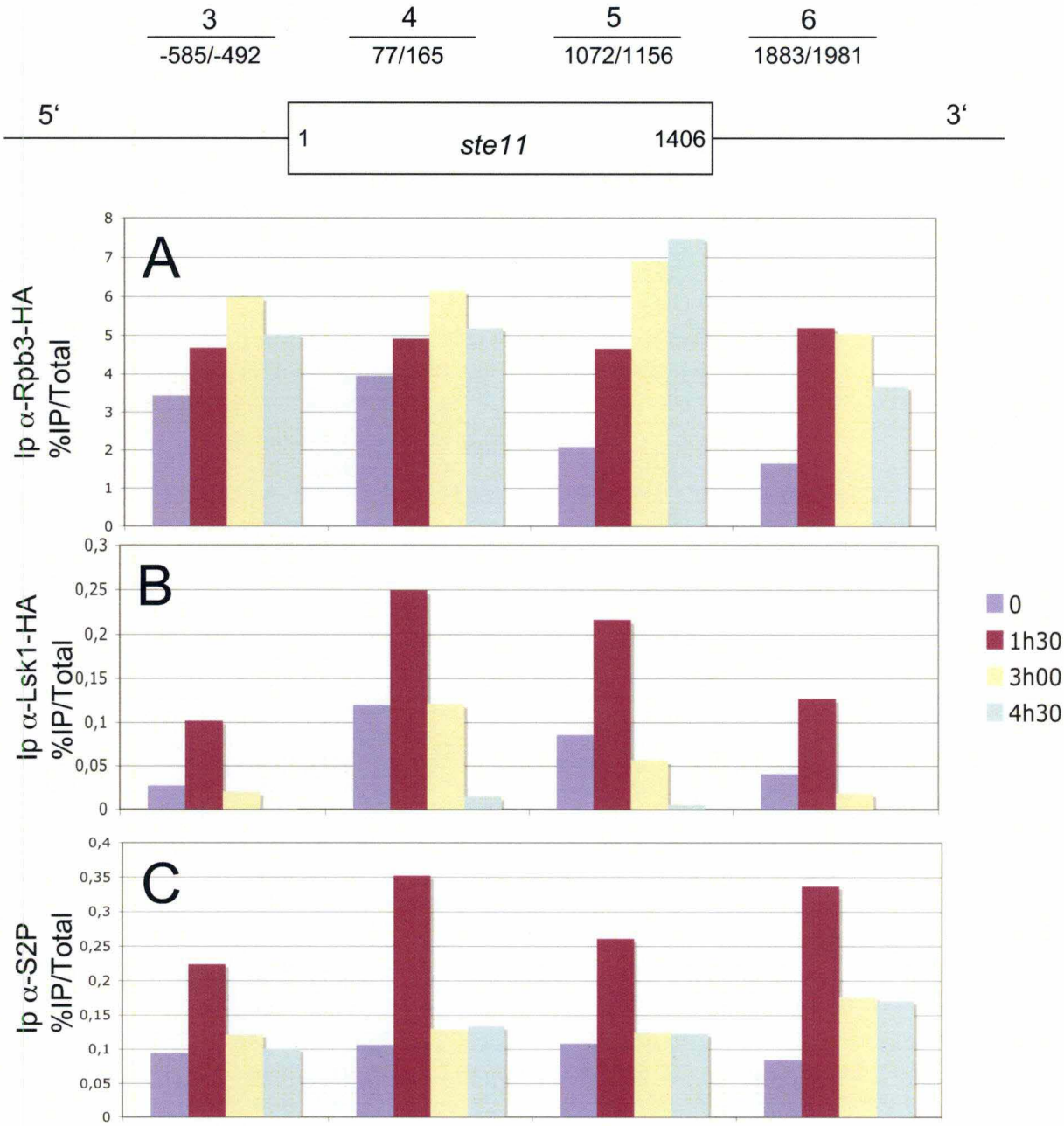

Figure 9 : ChIP mettant en évidence le profil de l'ARN Pol II, Lsk1 et du CTD S2P de Pol II le long de l'unité de transcription ste11 dans une souche rpb3-3HA (594) (A) et lsk1-HA (597) (B-C) au cours d'une carence azotée.

Les positions des amplicons utilisés sont notées de façon relative à la première pb de l'ATG de ste11 et de 3 à 6. Les anticorps utilisés sont anti-HA (A), anti-HA (B) et anti-S2P (C). Les souches ont été cultivées en EMM. Au temps 0, le milieu est remplacé par de l'EMM dépourvu de source d'azote. Les échantillons sont récoltés aux temps 0, 1h30, 3h00 et 4h30. La manipulation a été réalisée en duplicat; un profil type est présenté.

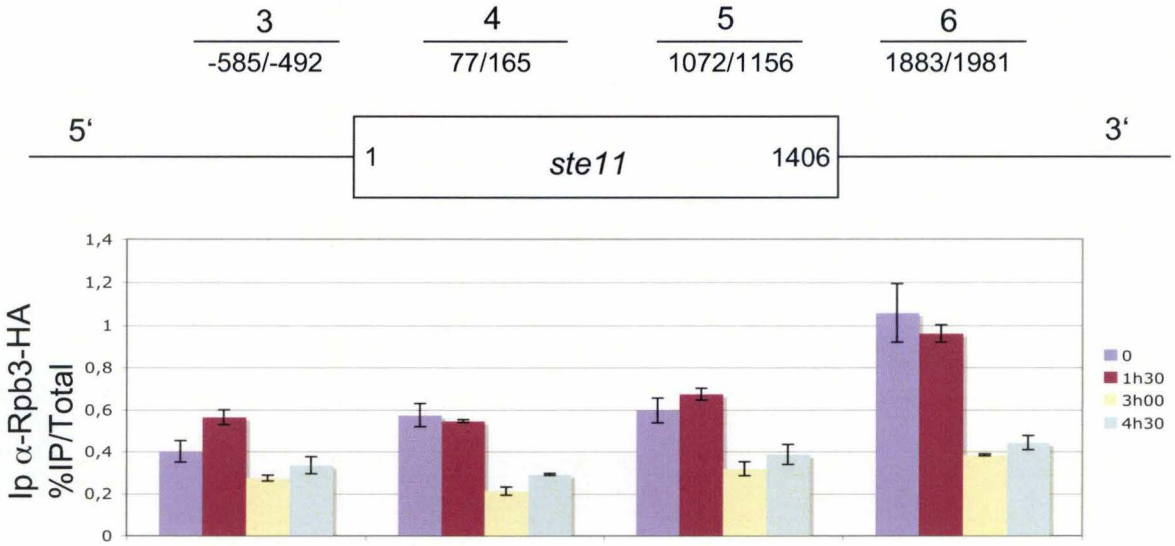

Figure 10 : ChIP mettant en évidence le profil de l'ARN Pol II le long de l'unité de transcription ste11 dans une souche rpb1 S2A (552) au cours d'une carence azotée.

Les positions des amplicons utilisés sont notées de façon relative à la première pb de l'ATG de ste11 et de 3 à 6. Les barres des histogrammes réfèrent à une moyenne de duplicats biologiques. L'anticorps utilisé est anti-HA. Les souches ont été cultivées en EMM. Au temps 0, le milieu est remplacé par de l'EMM déplété en azote. Les échantillons sont récoltés aux temps 0, 1h30, 3h00 et 4h30.

phosphorylation de la S2, et par extension le recrutement de la kinase, n'augmente en général que vers la fin de l'ORF. Après 3h00, la présence de la kinase Lsk1 rejoint son niveau basal, ce qui semble indiquer que le recrutement est limité dans le temps.
Nous avons ensuite voulu corréler le recrutement de Lsk1 avec la phosphorylation de la S2 pour examiner si la présence accrue de Lsk1 entraînait une augmentation de S2P. Le profil de la S2P a donc été établi dans les mêmes conditions **(Fig. 9 C)**.
De manière remarquable, le profil de la distribution de S2P est très similaire à ce qui est observé pour Lsk1 avec une augmentation forte dès le premier time point et une diminution ensuite.
Notre hypothèse est qu'une augmentation de la phosphorylation de S2 est requise pour une induction transcriptionnelle efficace de *ste11*. Une fois la réponse cellulaire à la carence azotée, et l'induction de *ste11* engendrées, le système retourne à un niveau basal de S2P à ce locus. Cette hypothèse explique les pics de Lsk1 et S2P observés, mais aussi la stérilité résultant de l'absence de S2P.

Le fait que le niveau de Lsk1 tombe sous son niveau basal au temps 4h30 dans la **Fig. 9 B** n'influence plus la quantité de S2P présente. En effet, la S2P atteint son pic au moment où Lsk1 est à un niveau maximal. La décroissance soudaine de S2P est probablement due à l'action combinée du retrait de Lsk1 et la présence de la phosphatase Fcp1[20]. Une expérience de ChIP pourrait permettre d'étoffer cette hypothèse.

L'existence d'un pic de recrutement de Lsk1 au locus *ste11* et le rôle essentiel que cette kinase et la phosphorylation de S2 jouent dans la différentiation sexuelle nous ont amené à nous demander ce qu'il advenait de la distribution de Pol II en condition de carence en azote quand S2 ne peut pas être phosphorylée. Pour explorer cette question, nous avons, comme précédemment, réalisé une expérience de carence en azote mais dans une souche S2A. La distribution de la Pol II a été établie par ChIP aux temps 0, 1h30, 3h00 et 4h30 après passage en milieu dépourvu d'azote (**Fig. 10**). Au lieu de montrer un profil similaire à celui observé à la **fig. 9 A**, c'est-à-dire une augmentation de l'abondance de la polymérase pendant les premiers time points, aucune augmentation n'est visible. Au contraire, la polymérase semble être déstabilisée de la chromatine et son abondance diminue.
Notre interprétation est que, pour une raison que nous ne comprenons pas encore, la phosphorylation de S2 est absolument requise durant l'induction transcriptionnelle de *ste11*, peut-être pour stabiliser la polymérase.
A ce stade, les données ci-dessus, avec le phénotype de stérilité observé quand le CTD ne peut pas être phosphorylé, nous ont amené à étudier directement comment l'abondance de l'ARN messager de *ste11* varie en condition d'induction, et ce dans différents mutants.

iii. Différences d'expression de l'ARNm *ste11* en fonction des souches wt, S2A ou *Δlsk1* en condition d'induction

Dans le point précédent, les observations ont porté sur le niveau chromatidien, et le profil de distribution de plusieurs protéines. Il convient maintenant de s'interroger sur le produit de la transcription, c'est-à-dire l'ARNm.

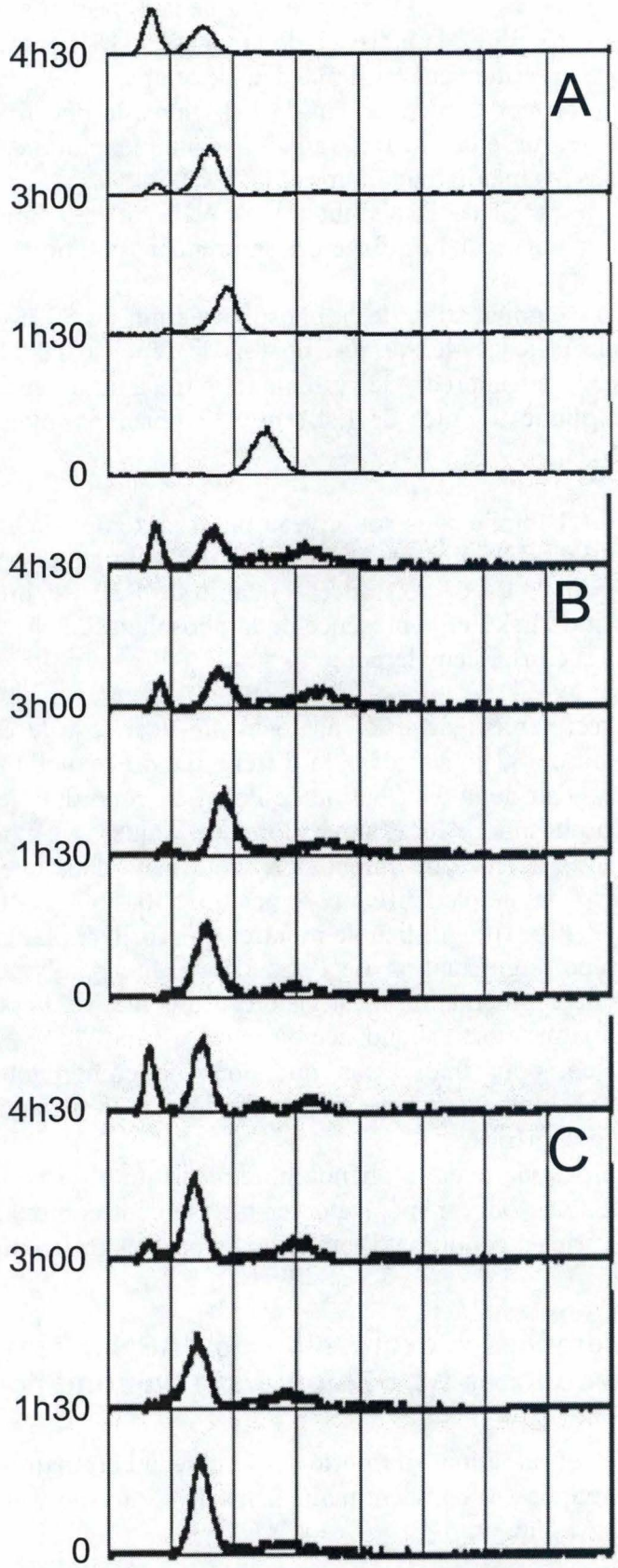

Figure 11 : Analyse au FACS du contenu en ADN des souches wt (536) (A), rpb1 S2A (552) (B) et lsk1::ura4 (581) (C) au cours d'une carence azotée.

La carence azotée est induite au temps 0. Les différents échantillons sont récoltés aux temps indiqués. Le pic principal au temps 0 représente un contenu en ADN 2N.

1. Monitoring du contenu en ADN des cellules en condition de carence azotée

Pour répondre à cette question, le gène *ste11* est induit par une carence azotée. Le procédé de filtration précédemment utilisé est à nouveau mis en œuvre. Pour s'assurer du bon déroulement de l'opération, les échantillons des différents temps et des différentes souches testées sont passés au FACS **(Fig. 11)**. La mise en page de cette figure est identique à celle de la **Fig. 8**. L'axe des ordonnées représente le temps alors que l'axe des abscisses mesure le contenu en ADN. Pour la souche wt **(Fig. 11 A)**, le profil montre clairement un arrêt en G1 au cours du temps, comme nous l'avons déjà dit. Nous avons également analysé les mutants S2A et Δ*lsk1*. Pour les souches dont le CTD n'est pas phosphorylé sur S2 **(Fig. 11 B-C)**, l'arrêt en G1 est également visible. Cette donnée est importante car elle indique que ces souches ne sont pas déficientes dans le blocage du cycle requis pour initier la différentiation sexuelle. C'est donc une étape en aval, très probablement l'induction transcriptionnelle de *ste11*, qui est déficiente et explique la stérilité observée dans le mutant S2A et en absence de *lsk1*. Il faut aussi noter que l'absence de S2P est associée à un profil de FACS particulier où un pourcentage faible de la population semble posséder un contenu en ADN plus élevé que 2N. Ce phénotype est le plus souvent expliqué par un défaut de cytokinèse ou une reréplication partielle. Cet aspect, qui reste marginal au sein de la population, n'a pas été étudié en détail au cours de ce travail.
Une fois ces vérifications sur la capacité d'arrêt en G1 effectuées, le niveau d'ARN a été mesuré dans les différentes souches.

2. Mesure de l'expression relative de l'ARNm de *ste11* via une q-RT PCR

Pour déterminer le contenu relatif en ARN des souches wt, S2A et *Δlsk1*, l'ARN total extrait est d'abord rétrotranscrit en ADNc. Une fois cela fait, son abondance relative est déterminée par PCR en temps réel. La normalisation se fait grâce l'ARN 25 S^{43} dont l'expression est supposée constante dans les souches mutantes que nous utilisons du fait qu'il est transcrit par l'ARN polymérase I qui ne possède pas de queue CTD.

La quantité relative d'ARN pour les différentes souches est présentée dans la **Fig. 12**. Bien que cette manipulation ait été réalisée plusieurs fois, un seul réplicat représentatif est présenté. Par définition, la valeur du temps 0 de la souche wt est fixée à 1. Les conditions de carence azotée sont décrites pour induire l'expression de l'ARNm du gène *ste11*, ce qui est confirmé ici. Pour la souche wt, le niveau d'expression de *ste11* augmente et culmine après 4h30 en étant 5 fois supérieur à celui du temps 0.
Les profils des souches S2A et *Δlsk1* sont semblables entre eux mais diffèrent fortement du contrôle. Deux choses sont remarquables dans ces souches. La première est que le niveau d'expression de l'ARNm de *ste11* est dramatiquement réduit dans ces deux mutants. Le niveau basal d'expression de *ste11* est au moins 5 fois plus faible que dans la souche wt. La seconde est que l'induction est très peu présente voire inexistante.

Ce niveau fortement réduit de l'expression de *ste11* dans les mutants étudiés ici nous enseigne plusieurs choses. La quantité présente de messager est tellement faible par rapport à la souche sauvage qu'il est probable que le niveau de la protéine Ste11 soit également très réduit. Un Western Blot pourrait confirmer cette hypothèse.

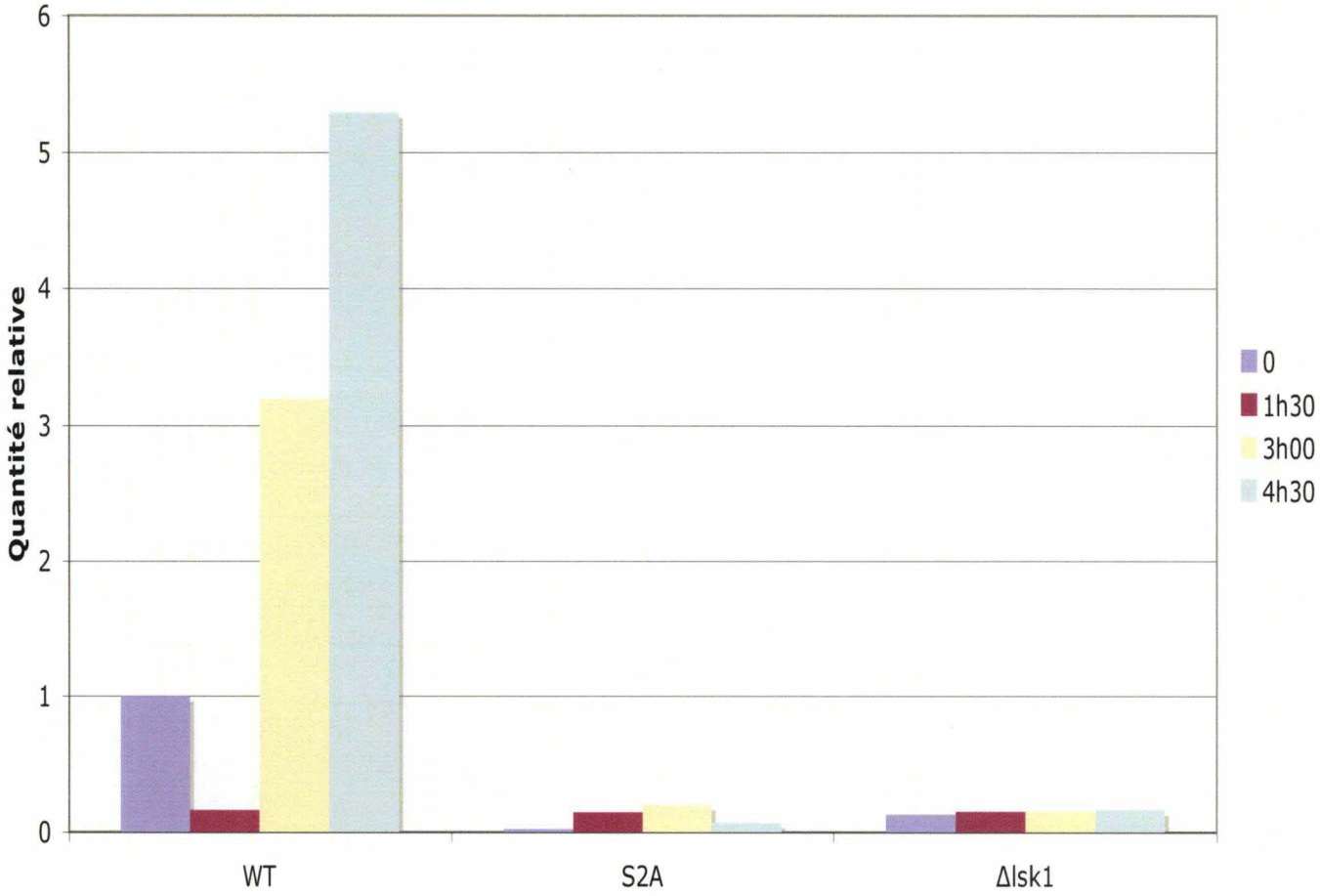

Figure 12 : Expression relative de l'ARNm de ste11 dans les souches wt (594), rpb1 S2A (552) et lsk1::ura4 (581) au cours d'une carence azotée. *Les souches ont été cultivées en EMM. Au temps 0, le milieu est remplacé par de l'EMM déplété en azote. La quantité relative d'ARNm par rapport à la souche wt au temps 0 est indiquée pour les temps 0, 1h30, 3h00 et 4h30 en carence en azote. Ces quantitées sont normalisées grâce au transcrit de l'ARN 25S. La manipulation a été réalisée en duplicat; un profil type est présenté.*

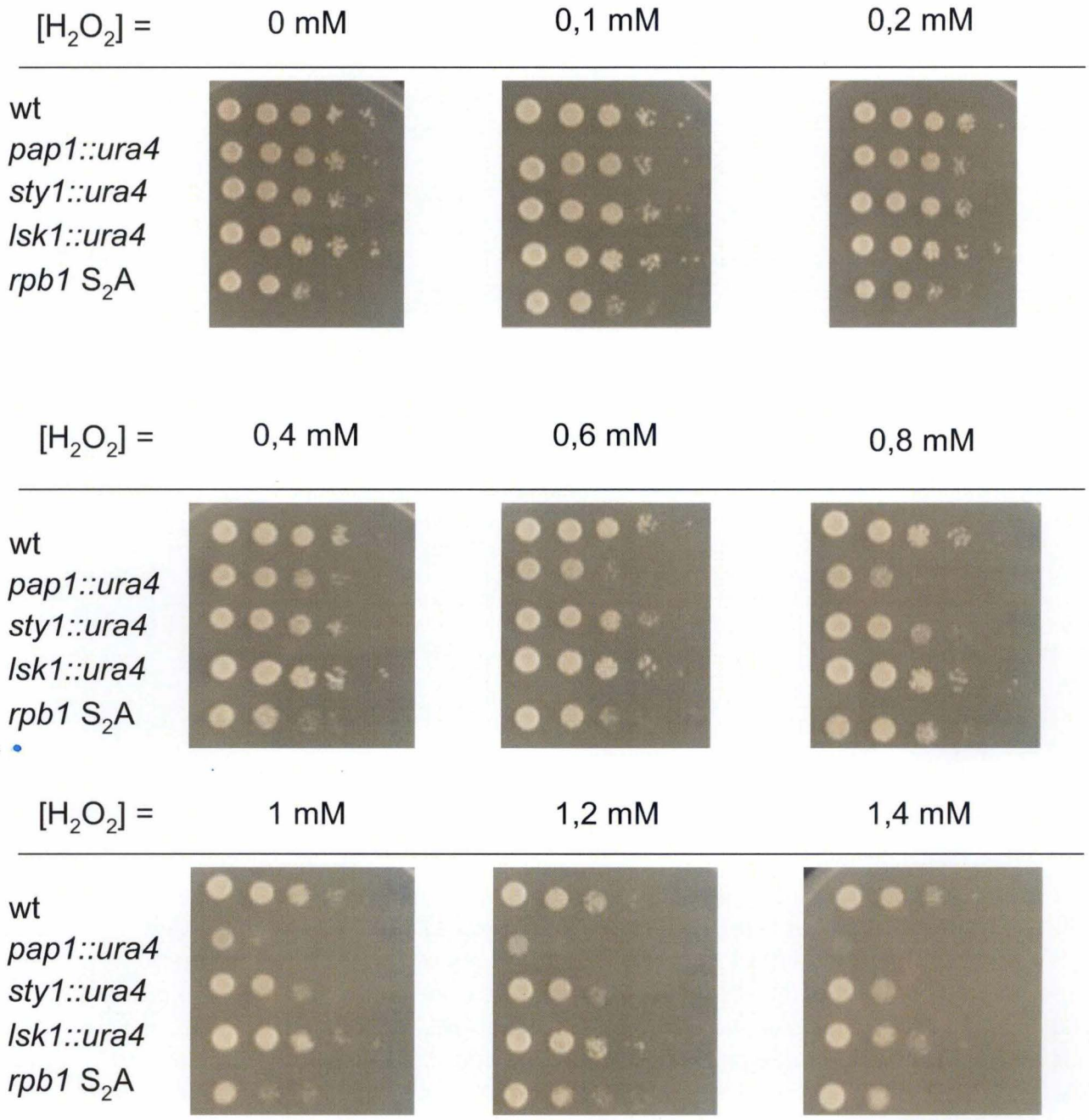

Figure 13 : Test de croissance de souches de S. pombe sur YES en présence de peroxyde d'hydrogène.

Les boites de Pétri comportent une concentration croissante de peroxyde d'hydrogène allant de 0 mM à 1,4 mM comme indiqué. Les souches testées sont : wt (94) , sty1::ura4 (375), pap1::ura4 (376), lsk1::ura4 (461) et rpb1 S2A (552). Pour chaque souche, des dilutions de 10 en 10 ont été spottées.

Cette expérience confirme notre hypothèse que la stérilité des souches S2A et *Δlsk1* est due à l'absence d'induction de *ste11* en condition de carence en azote.
Nous concluons que, de manière inattendue, et contrairement à la majorité des gènes de *S. pombe*, l'induction de *ste11* requiert absolument la phosphorylation de la S2 dans le CTD. Cette caractéristique est à relier à la distribution non-canonique de Lsk1 et S2P qui sont déjà enrichis sur les régions 5' de l'unité de transcription de *ste11*, bien que nous ignorons si ceci est fonctionnellement relevant.

b. Etude du gène pap1

Etant donné le comportement très spécifique des mutants de la S2P en regard de l'expression du gène *ste11*, et la localisation particulière de S2P au locus *ste11*, nous avons étudié la possibilité que le groupe de gènes détecté en ChIP-on-chip avec un profil S2P similaire puisse avoir la même dépendance à la phosphorylation de la S2 pour leur expression.
Pour aborder à cette question, notre attention s'est ensuite portée sur le gène *pap1* qui encode un facteur de transcription impliqué dans la résistance au stress oxydatif, et qui appartient également au groupe de gènes possédant une région 5' UTR riche en S2P.

i. Test de croissance dans des conditions de stress oxydatif

Etant donné la présence potentielle de S2P dans la région promotrice du gène *pap1*, un parallélisme a été établi avec les expériences réalisées pour *ste11*. Notre rapporteur de l'induction transcriptionnelle consistant cette fois en la croissance en présence de peroxyde d'hydrogène. Les différentes souches utilisées précédemment ont été étalées sur milieux riches contenant des concentrations croissantes en peroxyde d'hydrogène **(Fig. 13)** communément utilisé pour induire un stress oxydatif.
En plus d'une souche wild type, deux autres souches références sont utilisées : *Δpap1* et *Δsty1* décrites comme hypersensibles à l'H_2O_2 respectivement à des concentrations faibles (0.2 mM) et élevées (1.0 mM)[35]. Elles servent à vérifier que le peroxyde d'hydrogène présent dans les boîtes est efficace et est conforme aux concentrations calculées, mais aussi, le cas échéant, à estimer le degré de sensibilité des mutants de phosphorylation du CTD.

La souche *Δpap1* montre effectivement une sensibilité plus accrue au stress oxydatif que la souche *Δsty1*. Cependant, la concentration théorique à laquelle le mutant *Δpap1* devrait se montrer sensible est de 0.2 mM. Ici, la souche *Δpap1* commence à montrer un retard de croissance par rapport à la souche wt à la concentration de 0.4 mM d'H_2O_2. Ces différences pourraient résulter du fait que le peroxyde d'hydrogène est ajouté au milieu encore chaud pour éviter la solidification de l'agar. A une température trop importante, l'H_2O_2 est transformé en H2O et un demi O_2. Le titre en agent oxydant est peut-être de ce fait diminué. Ce paramètre n'est pas facilement contrôlable et pour cette raison, toutes les souches sont striées simultanément sur la même boîte. La souche *Δsty1* commence à montrer une sensibilité plus accrue que la souche wt à une concentration plus élevée de 1.4 mM.
Les mutants S2A et *Δlsk1* ont été testés dans les mêmes conditions. Le mutant S2A montre un retard de croissance en comparaison avec la souche sauvage, même en l'absence de stress. Pour prendre en compte ce retard, la croissance de cette souche est à comparer à la

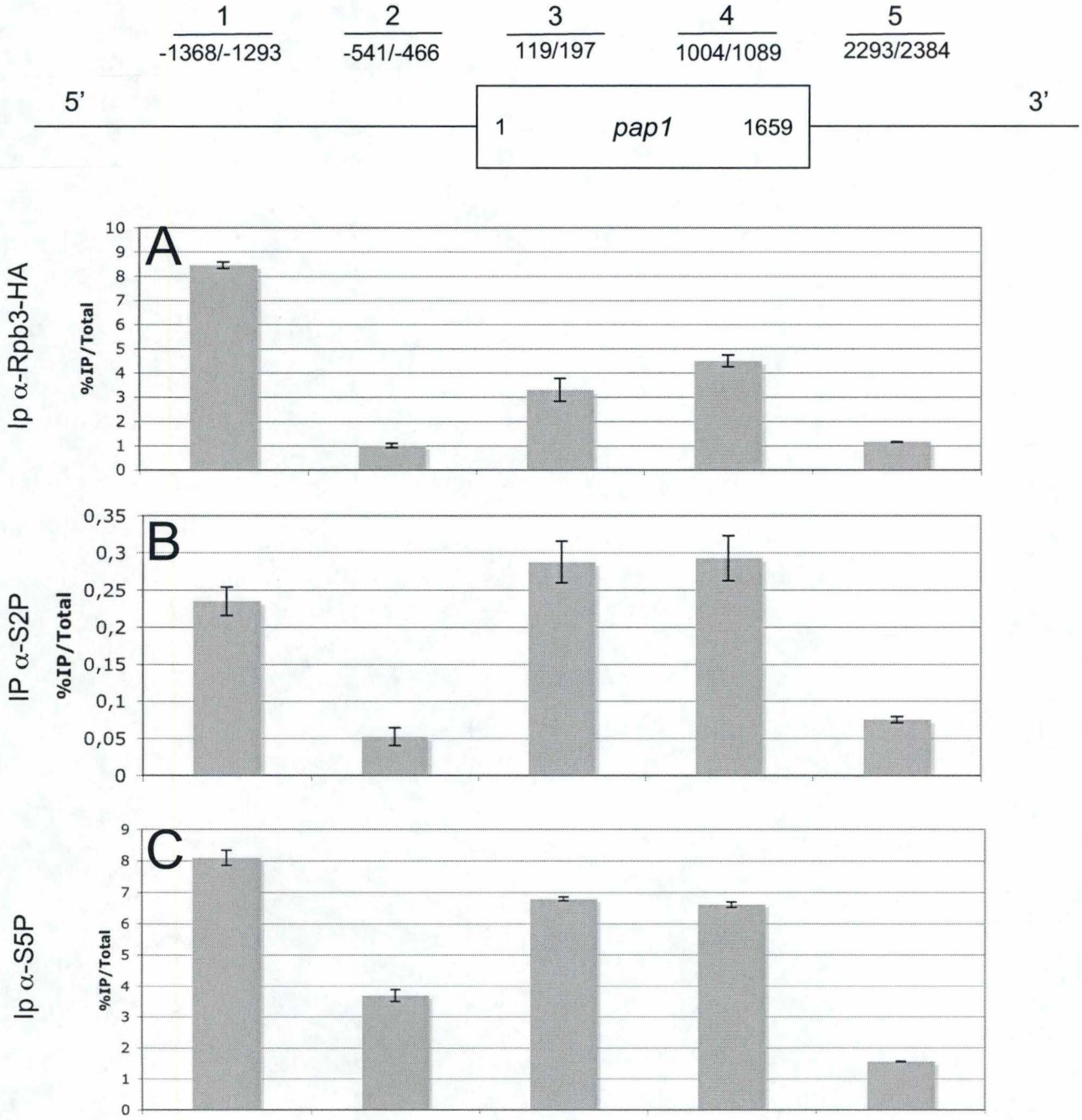

Figure 14 : ChIP mettant en évidence le profil de l'ARN Pol II (A), du CTD S2P (B) et S5P (C) de Pol II le long de l'unité de transcription pap1 dans une souche rpb3-3HA (594) en croissance végétative.

Les positions des amplicons utilisées sont notés relativement à la première pb de l'ATG de pap1 de 1 à 5. Les barres des histogrammes réfèrent à une moyenne de duplicats biologiques. Les anticorps utilisés sont anti-HA (A), anti-S2P (B) et anti-S5P (C). Les souches ont été cultivées en YES.

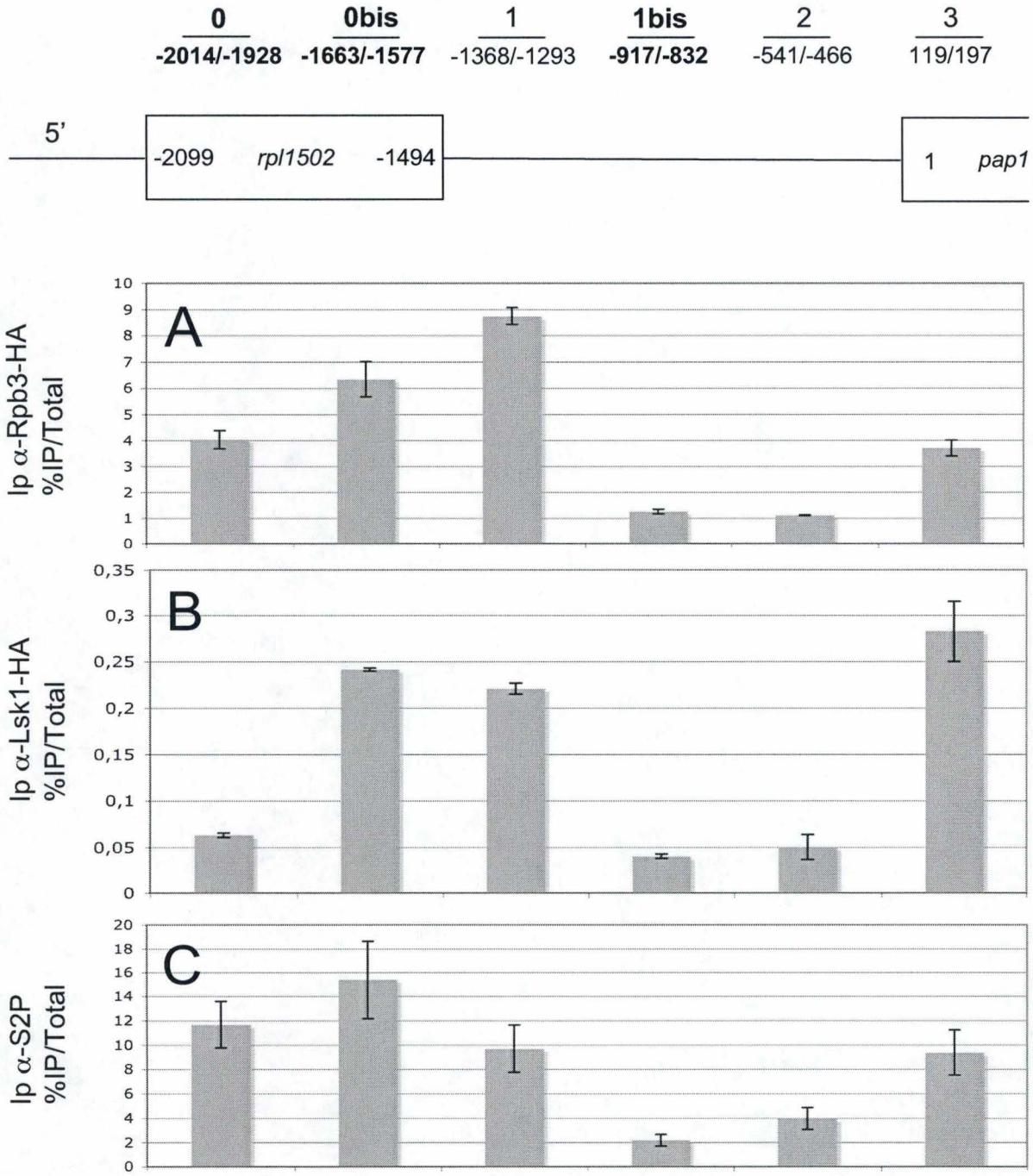

Figure 15 : ChIP mettant en évidence le profil de l'ARN Pol II (A), du CTD S2P (B) et S5P (C) de Pol II le long de l'unité de transcription rpl1502 et pap1 dans une souche rpb3-3HA (594) en croissance végétative.

Les positions des amplicons utilisées sont notées relativement à la première pb de l'ATG de pap1 de 0 à 5. Les amplicons dont la numérotation apparait en rouge sont ceux qui ont été rajoutés par rapport à la figure précédente. Les barres des histogrammes réfèrent à une moyenne de duplicats biologiques. Les anticorps utilisés sont anti-HA (A), anti-S2P (B) et anti-S5P (C). Les souches ont été cultivées en YES.

condition contrôle, et pas à la souche wt. On observe alors que la présence de peroxyde n'aggrave pas le phénotype du mutant S2A. Quant au mutant *Δlsk1*, il se comporte de façon très semblable la souche wt du point de vue de la sensibilité à l'augmentation de la concentration en H_2O_2.
Cette expérience nous apporte l'information suivante : l'absence de phosphorylation de la S2 dans le CTD n'entraîne pas de sensibilité particulière à des concentrations croissantes en peroxyde d'hydrogène. Nous avons toutefois étudié l'induction au niveau moléculaire, puisqu'il est possible qu'un effet soit présent mais ne soit pas discernable par ce type de test.

ii. Analyse de l'ARN Polymérase II sur le gène *pap1* via des expériences de ChIP

1. En absence de stress

Comme pour *ste11*, l'expérience de ChIP-on-chip révélait la présence de S2P dans la région 5' UTR du gène *pap1* dans des conditions végétatives, nous avons commencé par vérifier cette donnée par ChIP. Une expérience similaire à celle décrite dans la **Fig. 7** a été réalisée en absence de stress **(Fig. 14)**.
Comme précédemment, c'est d'abord le profil de la Pol II qui est observé **(Fig. 14 A)**. Ce profil est très inhabituel et montre un enrichissement très élevé pour le premier amplicon situé très en amont dans le 5' UTR. Entre les amplicons 2 et 4, la Pol II observe un profil plus habituel : une augmentation au fur et à mesure de la progression de la transcription. Ensuite le niveau retombe à nouveau au niveau de l'amplicon 5. Les profils de la S2P et S5P **(Fig. 14 B-C)** sont très similaires à celui de la polymérase et présentent la même caractéristique du côté 5'. L'information principale à retirer de la **Fig. 14** est donc la présence d'un pic au niveau de l'amplicon 1. Nous envisageons deux possibilités pour l'expliquer : le locus *pap1* possède un mode de transcription différent de ce qui a déjà été précédemment observé, soit ce pic résulte de la proximité de la région 3' UTR du gène situé directement en amont de *pap1*. Ce gène porte le nom de *rpl1502* et code pour une protéine ribosomale 60S.

Pour tester la seconde hypothèse, nous avons exploré la région en amont de *pap1* en définissant des nouveaux amplicons (0 et 0-bis) en amont et en ajoutant un amplicon entre l'amplicon 1 et 2 (1-bis). En continuité avec la **Fig. 14**, la **Fig. 15** reprend les résultats obtenus avec ces nouveaux couples d'oligos.
Le profil de Pol II a, ici aussi, été observé en premier lieu **(Fig. 15 A)**. En se penchant sur le profil qui couvre le gène *rpl1502*, il apparaît très probable que l'amplicon 1 appartient à la région 3' UTR de celui-ci plutôt qu'à la région 5' UTR de *pap1*. L'amplicon 1-bis révèle des valeurs semblables à l'amplicon 2. Il est donc probable que l'amplicon 1bis situé entre 917 et 832 pb en amont du A de l'ATG de *pap1* soit situé en 5' UTR du gène *pap1*. Nous pouvons donc conclure une localisation approximative du site +1 de *pap1* entre la pb -1293 et -917.

Afin de vérifier que l'amplicon 1 se situe dans la région 3' UTR de *rpl1502*, le profil S2P est observé **(Fig. 15 B)**. Les résultats obtenus concordent avec ceux de la **Fig. 15 A**. Le profil S2P suit ce qui est communément attendu pour le gène *rpl1502*. Dans les 100 premières pb le niveau de phosphorylation de la S2 est relativement faible pour augmenter au cours de la transcription lors de la phase d'élongation et culminer au niveau de l'amplicon 1.
Cette analyse plus détaillée des deux locus permet d'observer les deux unités de transcription. Comme nous l'avons dit, il est très probable que la région couverte par l'amplicon 1

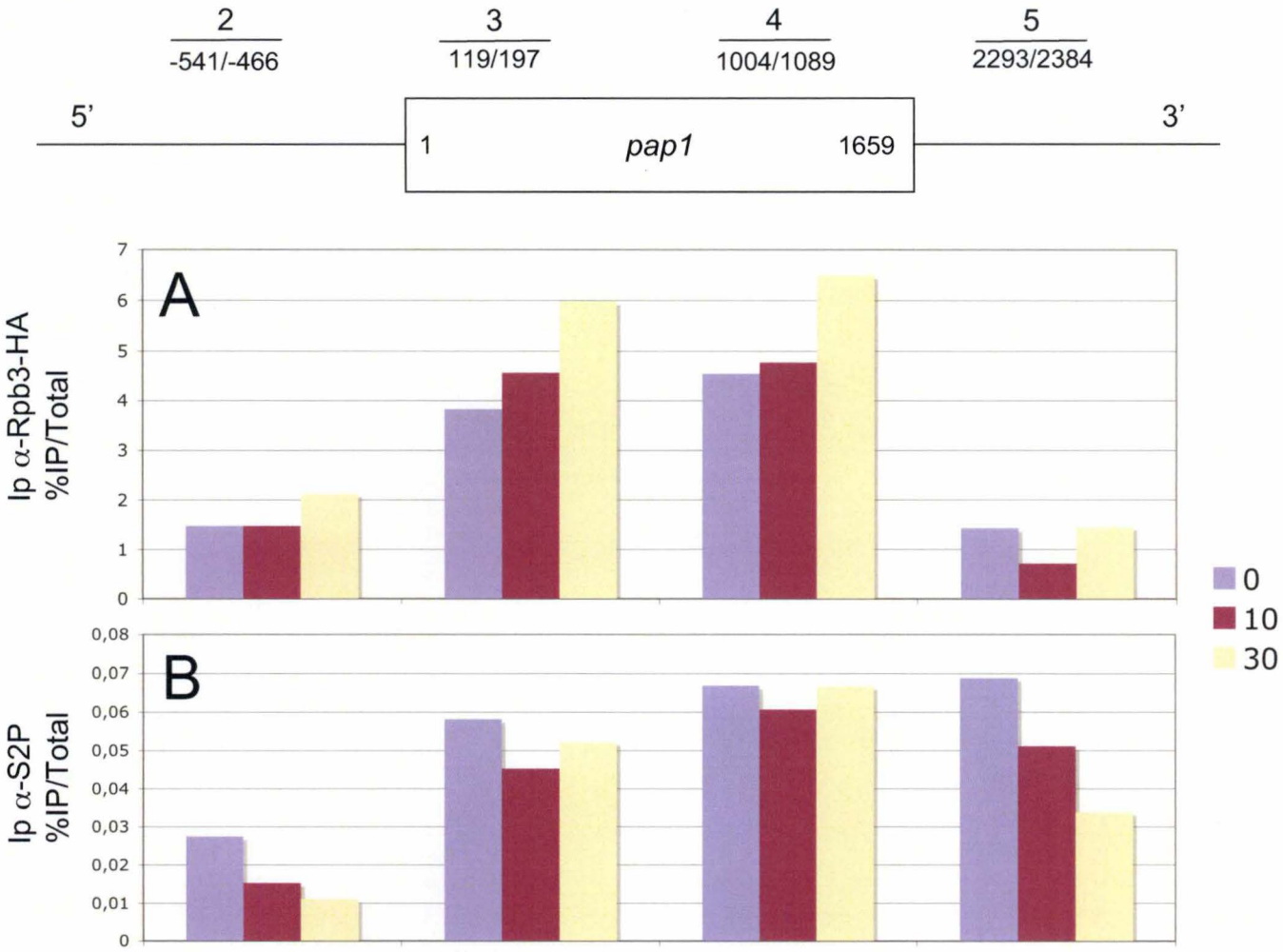

Figure 16 : ChIP mettant en évidence le profil de l'ARN Pol II (A) et du CTD S2P (B) de Pol II le long de l'unité de transcription pap1 dans une souche rpb3-3HA (536) au cours d'une induction par le peroxyde d'hydrogène à une concentration de 1,0 mM.
Les positions des amplicons utilisés sont notées de façon relative à la première pb de l'ATG de pap1 et de 2 à 5. Les anticorps utilisés sont anti-HA (A) et anti-S2P (B). Les souches ont été cultivées en YES. Au temps 0, du peroxyde d'hydrogène est ajouté au milieu de façon à obtenir une concentration de 1,0 mM dans le milieu. Les échantillons sont récoltés aux temps 0, 10 et 30 minutes. La manipulation a été réalisée en duplicat; un profil type est présenté.

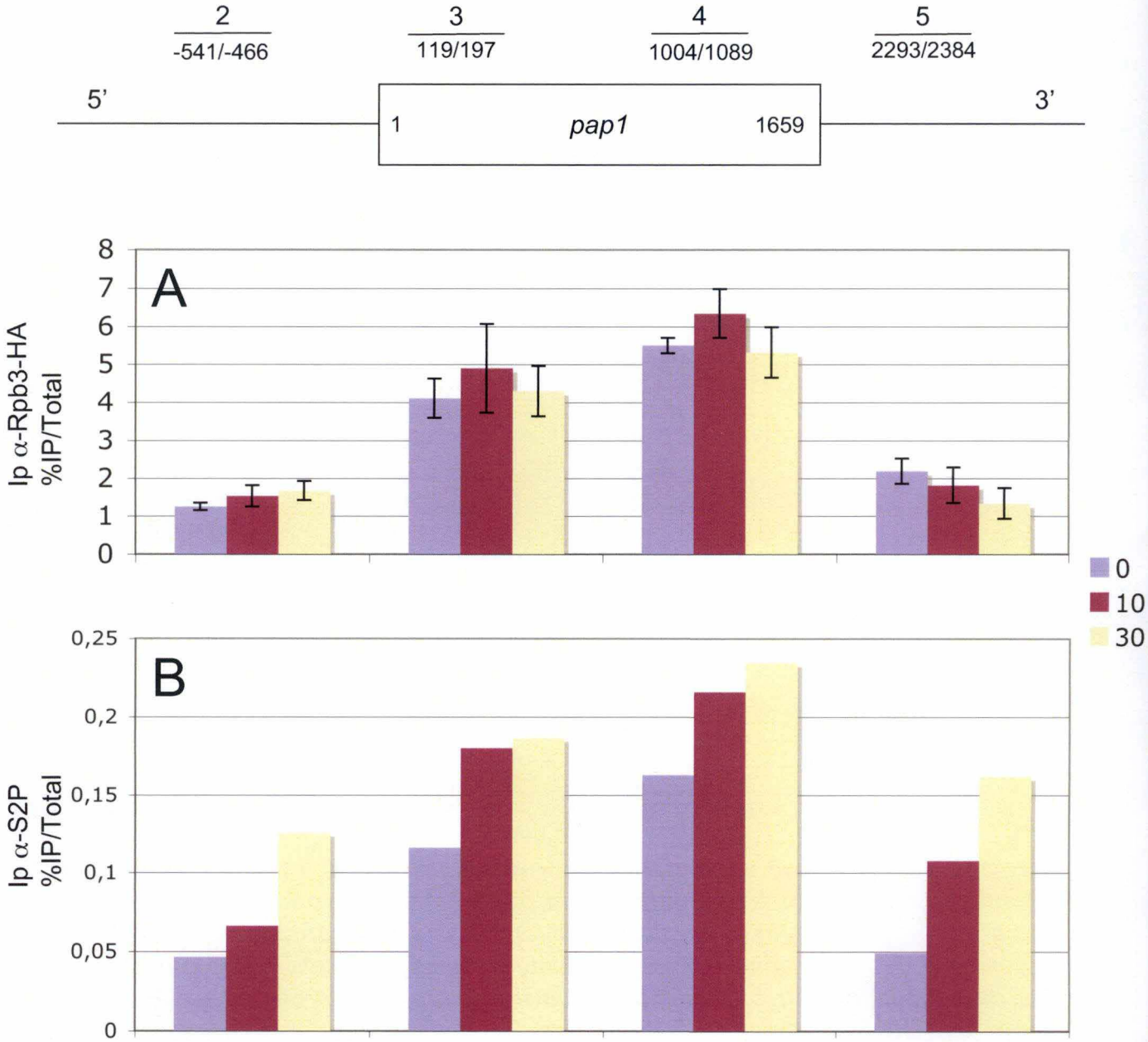

Figure 17 : ChIP mettant en évidence le profil de l'ARN Pol II (A) et du CTD S2P (B) de Pol II le long de l'unité de transcription pap1 dans une souche rpb3-3HA (536) au cours d'une induction par le peroxyde d'hydrogène à une concentration de 0,2 mM.
Les positions des amplicons utilisés sont notées de façon relative à la première pb de l'ATG de pap1 et de 2 à 5. Les anticorps utilisés sont anti-HA (A) et anti-S2P (B). Les souches ont été cultivées en YES. Au temps 0, du peroxyde d'hydrogène est ajouté au milieu de façon à obtenir une concentration de 0,2 mM dans le milieu. Les échantillons sont récoltés aux temps 0, 10 et 30 minutes. La manipulation a été réalisée en duplicat. Les barres des histogrammes réfèrent à une moyenne de duplicats biologiques (A) et un profil type est présenté (B).

n'appartienne pas à l'unité de transcription de *pap1*. Notre hypothèse est que la proximité entre les deux phases ouvertes de lecture a pu tromper l'analyse statistique réalisée en ChIP-on-chip. Ceci pourrait expliquer que *pap1* ait été classé dans la catégorie des gènes dont le 5' UTR est enrichi en S2P.

2. En condition d'induction

Le gène *pap1* code, nous l'avons vu, pour un facteur de transcription jouant un rôle dans la réponse au stress oxydatif. Les données relatives à sa régulation post-traductionnelle sont abondantes, mais peu de choses sont connues sur les contrôles transcriptionnels.
Dans la littérature, le peroxyde d'hydrogène est traditionnellement utilisé pour activer Pap1, ce qui résulte en une réponse cellulaire rapide de l'ordre des 15 minutes.

Pour étudier l'induction transcriptionnelle de *pap1* en ChIP, une concentration de 1.0 mM H_2O_2 a été utilisée **(Fig. 16)** avec la même logique que celle précédemment suivie : le profil de la Pol II est d'abord observé **(Fig. 16 A)**, puis celui de S2P **(Fig. 16 B)**.
Globalement, une légère augmentation de la présence de la polymérase est observée. Cette augmentation se fait progressivement au cours du temps. Il est vraisemblable qu'un point pris de façon plus éloignée dans le temps montrerait un retour à la normale. D'après la littérature qui indique que la protéine Pap1 est requise aux faibles niveaux de stress oxydatif, il est possible que la réponse soit différente à une concentration de 0.2 mM. Cette hypothèse sera testée dans la figure suivante **(Fig. 17)**.

Le profil de la S2P est également testé **(Fig. 16 B)**, mais aucune augmentation de S2P n'est mise en évidence pendant l'induction. Nous concluons que la présence de peroxyde entraîne une légère augmentation de la présence de Pol II sans augmentation significative de S2P.

Afin d'effectuer une comparaison avec la figure précédente, la même expérience est réalisée mais avec une concentration en H_2O_2 de 0.2 mM **(Fig. 17)**. Cette concentration étant optimale pour activer la protéine Pap1, il est intéressant de voir son effet au niveau transcriptionnel.

Le profil de la Pol II est d'abord observé **(Fig. 17 A)**. De nouveau, une légère augmentation est présente au sein de l'ORF au temps 10 minutes. Après 30 minutes, le pourcentage d'immunoprécipitation de la Pol II retourne à son niveau basal. Dans les régions 5'- et 3' UTR, les profils montrent respectivement une augmentation et une diminution graduelle et très légère de 0 à 30 minutes. L'importance biologique de ce phénomène est vraisemblablement très limitée.

Ensuite, la S2P est observée **(Fig. 17 B)**. Ici, le graphe montre de façon homogène une augmentation graduelle au cours du temps de la S2P. Ce phénomène est visible tant dans les région 5'- et 3' UTR qu'au sein de l'ORF.
Ce résultat est à mettre en comparaison avec celui présenté à la figure 16 où l'effet était limité, voire inverse. Donc, la concentration en H_2O_2 est peut-être critique pour l'induction transcriptionnelle de *pap1*.

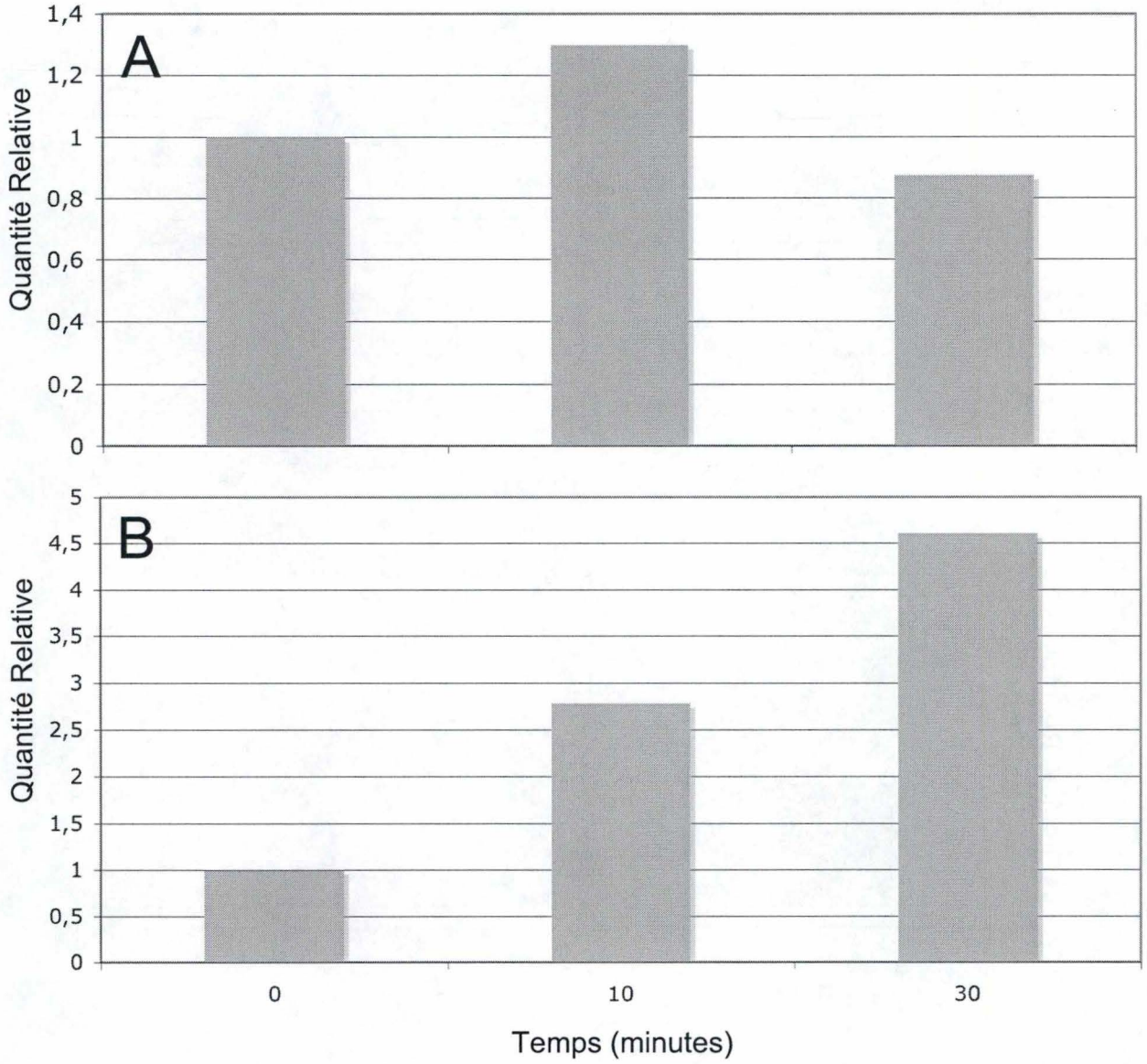

Figure 18 : Expression relative de l'ARNm de pap1 (A) et de pof14 (B) en induction par le peroxyde d'hydrogène dans une souche wt (536).
La quantité relative d'ARNm est mesurée au cours du temps après induction de peroxyde d'hydrogène à une concentration de 1,0 mM. Les graphes A et B montrent respectivement la quantité relative d'ARNm de pap1 et pof14. Ces graphes sont normalisés via le gène de l'ARN 25S. Les échantillons sont récoltés aux temps 0, 10 et 30 minutes. La manipulation a été réalisée une fois.

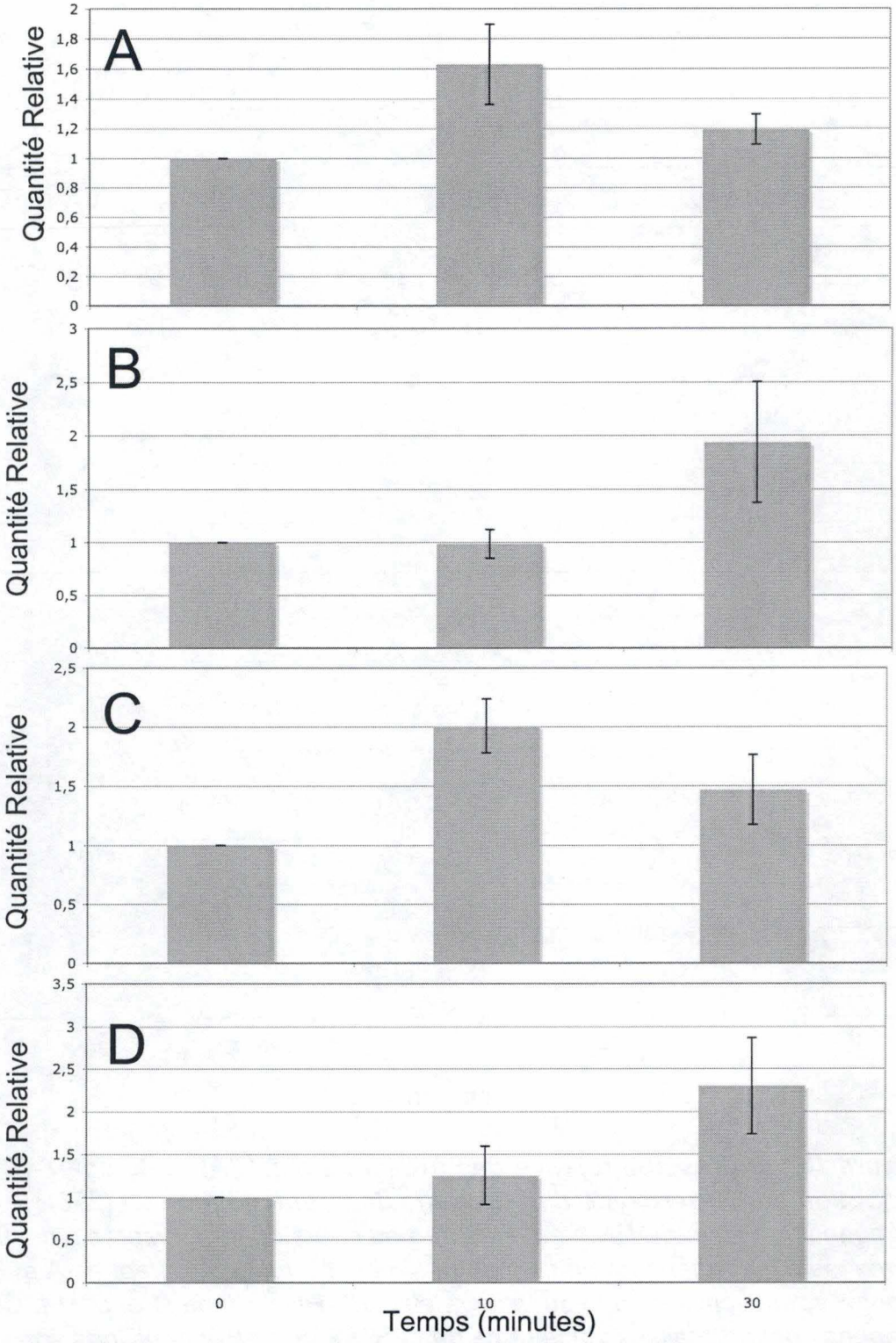

Figure 19 : Expression relative de l'ARNm de pap1 (A;C) et de pof14 (B;D) en induction par le peroxyde d'hydrogène dans une souche wt (536).
La quantité relative d'ARNm est mesurée au cours du temps après induction par le peroxyde d'hydrogène à une concentration de 0,2 mM. Les graphes A et B montrent respectivement la quantité relative d'ARNm de pap1 et pof14 normalisées via le gène de l'ARN 25S. Les graphes C et D montrent respectivement la quantité relative d'ARNm de pap1 et pof14 normalisées via le gène act1. Les échantillons sont récoltés aux temps 0,10 et 30 minutes. Les barres des histogrammes réfèrent à une moyenne de triplicats biologiques.

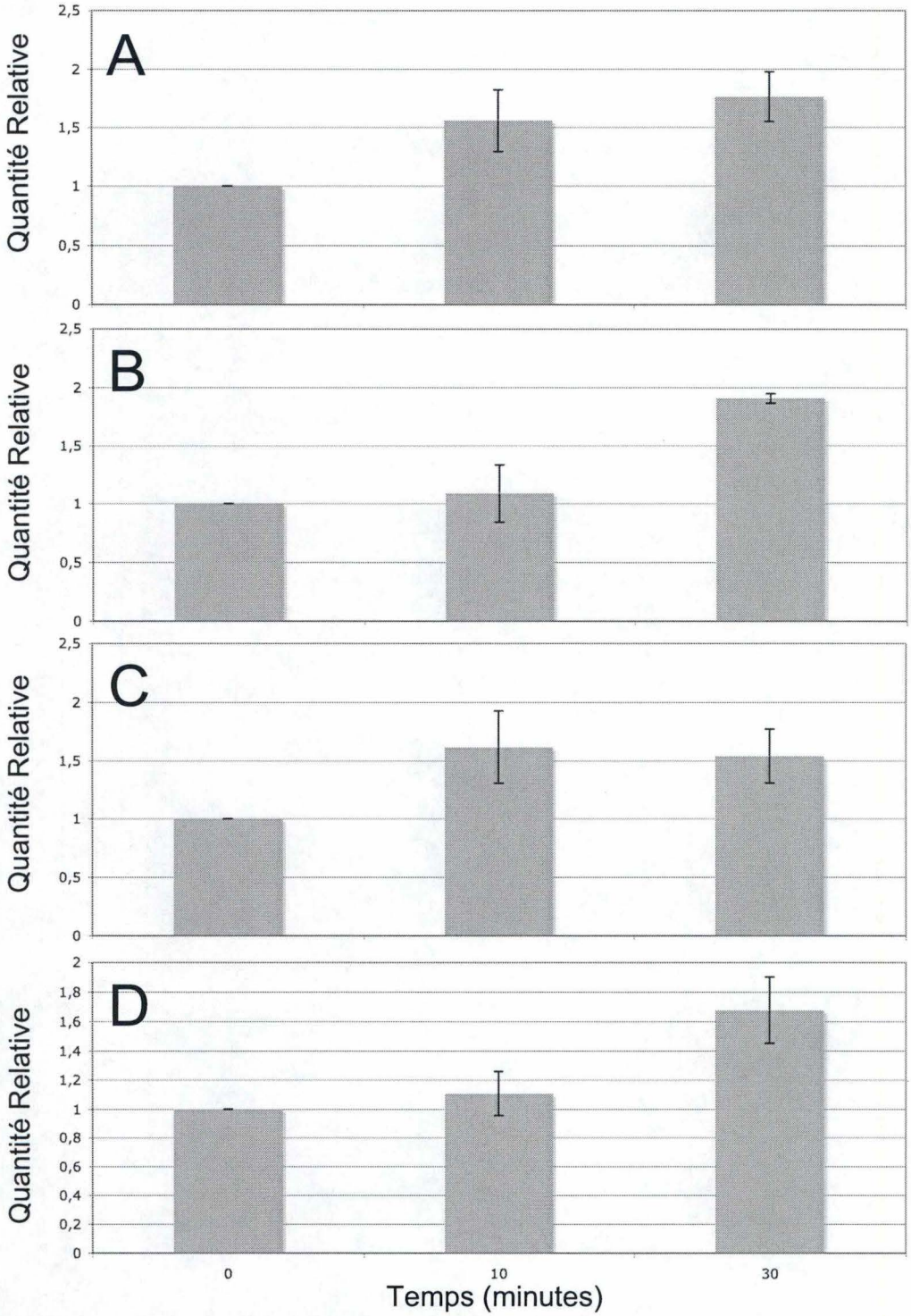

Figure 20 : Expression relative de l'ARNm de pap1 (A;C) et de pof14 (B;D) en induction par le peroxyde d'hydrogène dans une souche rpb1 S2A (552).

La quantité relative d'ARNm est mesurée au cours du temps après induction au peroxyde d'hydrogène à une concentration de 0,2 mM. Les graphes A et B montrent respectivement la quantité relative d'ARNm de pap1 et pof14. Ces graphes sont normalisés via le gène de l'ARN 25S. Les graphes C et D montrent respectivement la quantité relative d'ARNm de pap1 et pof14. Ces gènes sont normalisés via le gène act1. Les échantillons sont récoltés aux temps 0,10 et 30 minutes. Les barres des histogrammes réfèrent à une moyenne de triplicats biologiques.

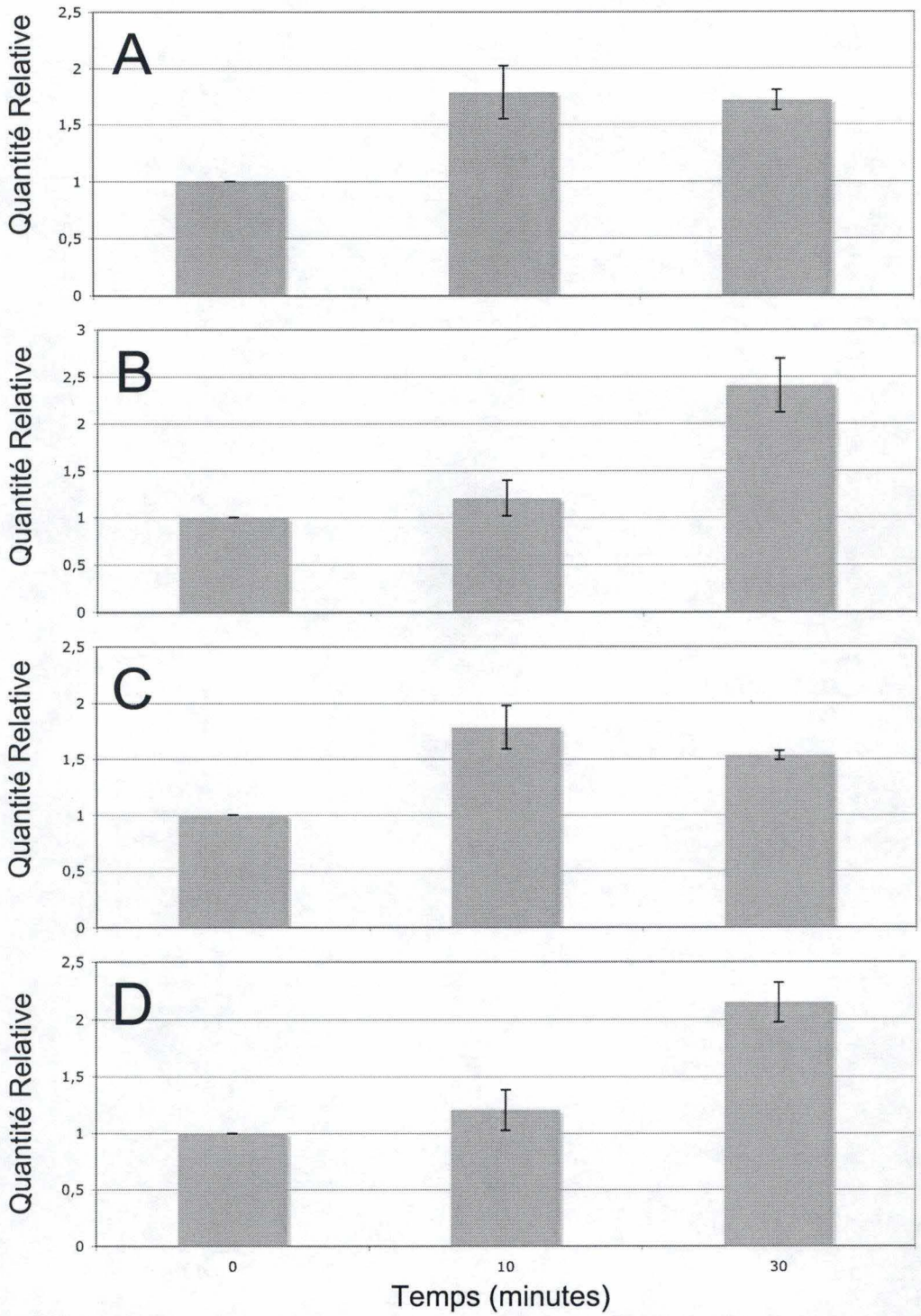

Figure 21 : Expression relative de l'ARNm de pap1 (A;C) et de pof14 (B;D) en induction par le peroxyde d'hydrogène dans une souche lsk1::ura4 (581).

La quantité relative d'ARNm est mesurée au cours du temps après induction de peroxyde d'hydrogène à une concentration de 0,2 mM. Les graphes A et B montrent respectivement la quantité relative d'ARNm de pap1 et pof14. Ces graphes sont normalisés via le gène de l'ARN 25S. Les graphes C et D montrent respectivement la quantité relative d'ARNm de pap1 et pof14. Ces gènes sont normalisés via le gène act1. Les échantillons sont récoltés aux temps 0,10 et 30 minutes. Les barres des histogrammes réfèrent à une moyenne de triplicats biologiques.

iii. Différences d'expression de l'ARNm *pap1* en fonction de la souche wt, S2A ou *Δlsk1*

Comme précédemment, nous avons ensuite voulu étudier l'effet d'un stress oxydatif sur le messager *pap1*, et l'effet éventuel de la S2P. Des données relativement préliminaires dans la littérature, basée sur une gène rapporteur, semblent indiquer que le stress oxydatif n'augmente pas la transcription du gène *pap1*[38]. Nous allons utiliser la q-RT-PCR pour étudier cette question directement sur le messager de *pap1*.
Comme lors des expériences de ChIP, une concentration de 1.0 mM en H_2O_2 est d'abord testée dans une souche wt **(Fig. 18)**. Comme contrôle de l'induction au peroxyde d'hydrogène, nous avons analysé le gène *pof14* **(Fig. 18 B)**. Ce gène code pour une enzyme clef de la synthèse de l'ergostérol. Cette molécule est un stéroïde apparenté au cholestérol. Il fait partie de la membrane cellulaire des levures et des champignons de manière plus générale. Il est connu pour être induit dans des conditions de stress oxydatif[44].
Son induction se déroule de manière graduelle de 0 à 30 minutes. Après 30 minutes, son expression est 4,5 fois supérieure au temps 0. Ce contrôle nous confirme que les cellules subissent un stress oxydatif. Après 10 minutes d'exposition à de l' H_2O_2 à une concentration de 1.0 mM, la quantité relative de l'ARNm de *pap1* passe de 1 à 1.3 **(Fig. 18 A)**. On observe donc une induction modeste qui s'estompe après 30 minutes. Pour les mêmes raisons évoquées plus haut, nous avons répété cette expérience à une concentration réduite à 0.2 mM. Lors de cette expérience, nous avons aussi utilisé, parallèlement à l'ARN 25 S, le gène *act1*[43] pour normaliser les résultats. Comme précédemment, *pof14* est utilisé comme contrôle du stress oxydatif **(Fig. 19 B ;D)**. L'induction de l'expression de ce gène est plus faible qu'avec des concentrations en H_2O_2 de 1.0 mM. Au lieu d'atteindre une augmentation de près de 5 fois, celle-ci est proche des 2 fois. Ceci est logique dans le cas de *pof14*. Plus le stress est important, plus la membrane cellulaire a besoin d'être imperméable aux agents oxydants[44]. C'est pourquoi la synthèse de l'ergostérol doit être diminuée. Ici, puisqu'un moins grand stress est présent, la réponse doit être moins forte. Ce contrôle permet de vérifier que les cellules subissent un stress oxydatif et que ce stress est moins fort que précédemment.
Comme à la concentration de 1 mM, une induction de *pap1* est aussi observée **(Fig. 19 A ;C)**. Après 10 minutes, elle est comprise entre 1.6 et 2 fois, selon que la normalisation est effectuée par l'ARN 25S ou *act1* respectivement. Nous concluons que le gène pap1 est induit au niveau transcriptionnel, et que cette induction est plus forte à faible dose en H_2O_2, en accord avec le rôle prépondérant de Pap1 aux faibles concentrations.

La présence d'une augmentation de l'ARN messager nous a permis de tester le rôle potentiel de S2P pour une induction efficace.

Nous avons analysé la souche S2A dans les mêmes conditions que l'expérimentation précédente **(Fig. 20)**. Le profil de *pof14* **(Fig. 20 B ;D)** ne montre pas de particularité dans son profil. Il observe la même forme que dans la **Fig. 19**. Les variations présentes d'une expérience à l'autre résultent de la variation biologique et ne seront pas commentées ici.
Le profil de *pap1* est ensuite observé **(Fig. 20 A ;C)**. Globalement, l'absence de S2P ne modifie pas l'induction de *pap1*, contrairement à ce que nous avions observé pour *ste11*. Cependant, après 30 minutes, nous n'observons pas de diminution de l'ARN messager dans la souche S2A, mais les différences étant faibles, il est sans doute prudent de ne pas tirer de conclusions fermes de cette observation. Enfin, quand l'expérience est réalisée dans une souche *Δlsk1* **(Fig. 21)**, l'induction de *pof14* est très similaire aux expériences précédentes. L'induction de *pap1* est semblable à celle présentée par la souche S2A.

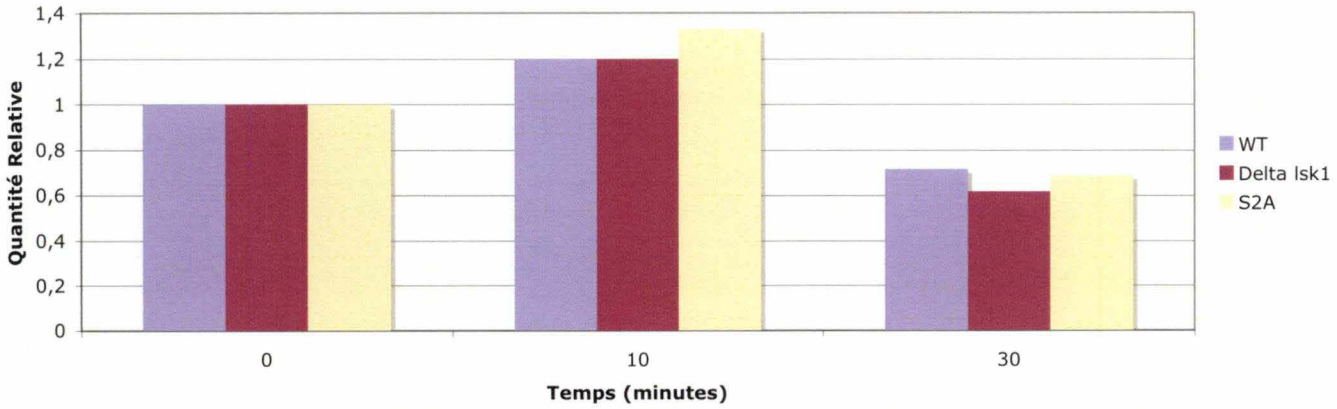

Figure 22 : Expression relative de l'ARNm de csx1 en induction par le peroxyde d'hydrogène dans les souches wt (536), Isk1::ura4 (581) et S2A (552).

La quantité relative d'ARNm est mesurée au cours du temps après induction de peroxyde d'hydrogène à une concentration de 0,2 mM. Ce graphe est normalisé via le gène de l'ARN 25S. Les échantillons sont récoltés aux temps 0,10 et 30 minutes. La manipulation a été réalisée une fois.

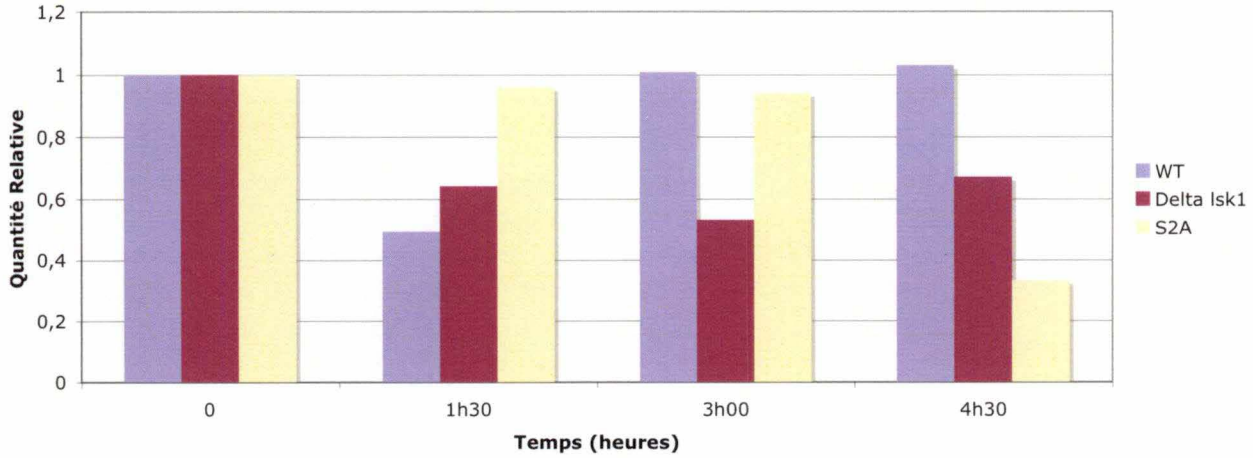

Figure 23 : Expression relative de l'ARNm de zfs1 dans les souches wt (536), Isk1::ura4 (581) et S2A (552) au cours d'une carence azotée.

Les souches ont été cultivées en EMM. Au temps 0, le milieu est remplacé par de l'EMM déplété en azote. La quantité relative d'ARNm est mesurée aux temps 0, 1h30, 3h00 et 4h30. Ce graphe est normalisé via le gène de l'ARN 25S. La manipulation a été réalisée une fois.

Malgré les faibles variations observées, notamment au temps 30 minutes, il est manifeste que S2P ne joue pas un rôle critique dans l'induction de *pap1*, contrairement à ce qui a été observé pour *ste11*.

c. Etude des gènes csx1 et zfs1

Comme indiqué dans l'introduction, à la fin de ce travail, nous avons réalisé quelques analyses préliminaires sur *csx1* et *zfs1* qui présentaient également une région 5' UTR riche en S2P dans le profil de ChIP-on-chip. Nous avons testé si la quantité de leur ARNm variait par rapport à une souche sauvage lorsque la phosphorylation de la S2 est empêchée.

i. Différences d'expression de l'ARNm de *csx1* et *zfs1* en fonction des souches wt, S2A ou *Δlsk1*

Pour ce faire, la quantité d'ARNm provenant des souches wt, *Δlsk1* et S2A est mesurée. Dans le cas de *csx1*, les cellules subissent un stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène à une concentration de 0.2 mM. Notons que les concentrations utilisées dans la littérature pour induire *csx1* sont de 1.0 mM[39]. Etant donné que des stocks d'ADNc ayant subi un stress oxydatif à l'H_2O_2 = 0.2 mM avaient déjà été réalisés, par manque de temps, ils ont été utilisés pour une manipulation pilote.
Pour l'étude de *zfs1*, les cellules subissent une carence en azote. Ce gène est connu pour être induit par une carence azotée[40]. Ici aussi, les ADNc proviennent d'un stock réalisé précédemment.

L'expérience portant sur *csx1* est présentée en **Fig. 22**. La souche sauvage montre une très légère induction au temps 10 minutes, ensuite, après 30 minutes, le niveau redescend sous le niveau du temps 0. Nous attendions une plus forte induction mais une concentration en H_2O_2 5 fois inférieure à ce qui est couramment testé est potentiellement responsable de ce phénomène. Il conviendrait de tester une concentration de 1.0 mM afin de vérifier si l'induction est plus forte à cette concentration.
Quoi qu'il en soit, le niveau d'expression de l'ARNm *csx1* est mesuré dans les souches *Δlsk1* et S2A. Globalement, ces deux mutants se comportent de manière très similaire à la souche sauvage.
Une conclusion à tirer de cette expérience est que la phosphorylation de la S2 ne joue pas un rôle clef dans l'expression du gène *csx1*. Toutefois, il convient de rappeler que cette manipulation n'a été réalisée que sur un seul échantillon biologique et dans des conditions sub-optimales. Afin de tirer des conclusions plus fiables, ce test devrait être réalisé à nouveau et ce, avec une concentration de 1.0 mM de peroxyde d'hydrogène dans le milieu.

L'expérience portant sur *zfs1* est présentée en **Fig. 23**. Le gène *zfs1* est induit par des conditions de carence en azote[40]. Or, dans cette expérience la souche wt ne montre aucune augmentation de l'ARNm de ce gène. Il présente même une décroissance après 1h30 pour ensuite revenir au niveau initial. Les raisons de ce profil surprenant sont inconnues. Dès lors, les données des souches S2A et *Δlsk1* ne peuvent être comparées à un contrôle digne de confiance. L'interprétation de ces données est donc compromise. La manipulation devrait être à nouveau réalisée afin d'obtenir un contrôle concluant et ainsi pouvoir interpréter les données. Notons que les profils des souches S2A et *Δlsk1* sont fort différents entre eux.

Habituellement, ces souches suivent le même profil. La manipulation est donc ici remise en cause.

5. Discussion

a. *pap1, un faux positif ?*

Hormis leurs fonctions biologiques différentes, les facteurs de transcription Ste11 et Pap1 partagent le fait de répondre à un stress : Ste11 est induit par une carence en azote et active la voie de différentiation sexuelle, et Pap1 répond à un stress oxydatif à faible dose en augmentant la transcription de gènes requis pour maintenir la viabilité cellulaire dans ces conditions. Du point de vue transcriptionnel, *ste11* et *pap1* appartiennent à un groupe de gènes sélectionnés au cours d'une analyse en ChIP-on-chip car ils présentent un enrichissement inattendu en S2P au niveau de leur région 5' UTR. Sur cette base, nous avons posé l'hypothèse que S2P pourrait jouer un rôle essentiel dans la transcription de ces deux gènes, contrairement au reste du génome. Les expériences réalisées pour tester cette hypothèse ont donné des résultats contrastés.

Premièrement, lorsqu'une souche dont la phosphorylation de la S2 est rendue impossible génétiquement est mise en présence des stress inducteurs de *ste11* ou *pap1*, les phénotypes sont très différents. D'une part, pour l'étude de *ste11*, les cellules ont été étalées sur des boîtes à faible teneur en azote pour induire la différentiation. Dans ce cas, les mutants S2A et *Δlsk1* montrent une efficience de croisement extrêmement réduite.
D'autre part, pour l'étude de *pap1*, différentes souches de *S. pombe* ont été étalées sur des boîtes comportant différentes concentrations en H_2O_2. Ici, les mutants S2A et *Δlsk1* ne montrent pas de sensibilité accrue à ce stress.
Ces données phénotypiques suggèrent donc que la phosphorylation de la sérine 2 au sein du CTD est absolument requise pour l'expression de *ste11*, mais pas pour celle de *pap1*.
Ensuite, lorsque le niveau d'expression des ARNm des gènes étudiés a été testé, *ste11* montrait un niveau d'expression très réduit dans les mutants de la phosphorylation de la S2, mais *pap1* ne montrait que très peu de différences entre les niveaux d'expression de son ARNm dans les souches sauvages versus S2A et *Δlsk1*.
Ces données sont en accord avec l'analyse phénotypique décrite ci-dessus.

La raison pour laquelle le gène *pap1* a été sélectionné lors de l'analyse ChIP-on-chip est la présence dans la région en amont de l'ORF de *pap1* d'un niveau de S2P élevé. Notre travail remet en question cette possibilité et suggère plutôt que le niveau élevé de S2P provient plus vraisemblablement de la région 3' UTR du gène en amont de *pap1*, *rpl1502*. Une cause possible de cette erreur d'interprétation est le fait que la région intergénique présente entre *rpl1502* et *pap1* est relativement courte. Seulement 1493 pb séparent respectivement les codons Stop et ATG de ces deux gènes. Dans le cas de *ste11*, la région intergénique entre l'ORF de SPBC26H8.12 (l'ORF en amont de *ste11*) et *ste11* est de 7611 pb. Cette distance est plus de 5 fois plus élevée que dans le cas de *pap1*.

La comparaison entre *ste11* et *pap1* nous amène à conclure que *pap1* ne possède pas, en définitive, un profil particulier de S2P dans sa région 5' UTR, et s'il l'est, ce n'est pas dans la même mesure que *ste11*.

b. Régulation transcriptionnelle du gène pap1

Ce travail a aussi été l'occasion d'explorer l'induction transcriptionnelle de *pap1* par le peroxyde d'hydrogène, un aspect méconnu de sa régulation. Nous avons vu que *pap1* est effectivement induit lorsque *S. pombe* est mis en présence de peroxyde d'hydrogène. Cette augmentation est plus grande à une concentration de 0.2 mM qu'à une concentration de 1.0 mM. Dans le premier cas, l'induction est estimée à 1,6 à 2 fois après 10 minutes, en fonction du gène utilisé pour la normalisation des échantillons : l'ARN 25S et *act1* respectivement. A 1 mM, l'induction est de 1.3 fois après 10 minutes.
Nous présentons ici une hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène. Par ailleurs, une piste permettant de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse sera proposée.
La protéine Pap1 a été présentée dans l'introduction comme un facteur de transcription dont le mécanisme de régulation est basé sur l'exportation permanente du noyau[36]. A un niveau élevé de stress oxydatif ($[H_2O_2]$ = 1.0 mM), Pap1 sera plus fortement exporté du noyau qu'à un faible niveau de stress oxydatif ($[H_2O_2]$ = 0.2 mM)[37].
Nous proposons qu'il existe en parallèle une induction modeste au niveau transcriptionnel. La région consensus de liaison à l'ADN du facteur de transcription Pap1 est la suivante : TTACGTAA[45]. Or, en amont du gène *pap1*, il existe une région dont la séquence est la suivante : TTACGTGT. Cette séquence est située entre 441 et 434 pb en amont du A de l'ATG de *pap1*. Ce site ne correspond pas exactement au site consensus de liaison de Pap1. Toutefois, 6 bases sur 8 sont identiques. La probabilité que ces 6 bases soient sélectionnées de manière aléatoire équivaut à 1 chance sur 4096. Et il faut également que cette séquence soit placée dans la région promotrice de *pap1*. Ceci diminue encore les chances que cette séquence soit là par hasard. Cependant, cette hypothèse reste toujours à démontrer.
Pap1 pourrait donc s'auto-activer lors l'induction. Il s'agit d'un phénomène fréquent qu'on retrouve notamment pour *ste11*.
Afin de vérifier si Pap1 est effectivement son propre activateur transcriptionnel, une expérience de ChIP pourrait être réalisée. Une immunoprécipitation de Pap1 nous indiquerait si, en condition de stress oxydatif, cette protéine est présente dans sa propre région promotrice.
Si ce modèle est avéré, le fait que l'induction soit modérée est probablement dû au fait que la séquence potentiellement reconnue ne comporte que 6 nt sur 8 identiques à la séquence consensus. Il est alors probable que la liaison de Pap1 à ce site ne se fasse pas de manière optimale et que l'expression ne soit pas maximale.
Une expérience qui pourrait nous éclairer à ce sujet serait de remplacer la séquence TTACGTGT par la séquence TTACGTAA et d'ensuite regarder l'expression du gène *pap1* dans ce mutant en conditions de stress oxydatif. Une autre expérience serait de supprimer cette séquence en amont de *pap1* et d'observer le niveau d'expression de *pap1*. Si dans le premier cas, l'induction est plus fortement et dans le deuxième moins fortement induite que dans le wt alors cette séquence en amont de *pap1* joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle de *pap1*.

c. zfs1 et csx1 sont-ils à placer sur le même plan que ste11 ou que pap1 ?

Dans le cas de *zfs1*, aucun avis tranché ne peut être exprimé en raison des problèmes rencontrés lors de la manipulation présentée dans la **Fig. 23**. Il faut noter que l'ORF en amont de ce gène est très éloignée, comme c'est le cas pour *ste11* ; il est donc très peu probable que

l'explication avancée pour *pap1* soit applicable ici. Des travaux complémentaires sont requis pour établir le degré de dépendance de la transcription de *zfs1* à S2P.

Dans le cas de *csx1*, bien que la manipulation présentée en **Fig. 22** n'ait été réalisée qu'une seule fois et que le contrôle ne montre pas une induction comparable à celle de *pof14*, certaines comparaisons peuvent être effectuées. Le gène *csx1*, montrant une réponse similaire à celle de *pap1*, semble également ne pas être affecté par l'absence de phosphorylation de S2. Par ailleurs, la proximité avec l'ORF précédente est intermédiaire par rapport à *ste11* et *pap1*. Il semble donc possible qu'on ait affaire à un recouvrement des régions 5' UTR et 3' UTR de deux gènes adjacents. Des travaux complémentaires devraient permettre de trancher cette question.

6. Perspectives

a. *La sérine 2 phosphorylée en début de transcription : un mécanisme de régulation génétique pour une certaine catégorie de gènes ?*

Nous avons vu qu'empêcher la phosphorylation de la S2 du CTD n'est pas létal. Cette mutation affecte légèrement la croissance végétative. Par contre, S2P est absolument requise pour la différentiation sexuelle et l'induction du gène *ste11*. En effet, dans le cas de *ste11*, les mutants de la phosphorylation de S2 présentaient un niveau d'expression de l'ARNm de *ste11* très fortement réduit par rapport à une souche sauvage. Alors que dans les cas de *pap1* et *csx1*, mais aussi de la majorité des gènes chez *S. pombe,* aucun effet de ce type n'est observable.
On est donc amené à se demander si la régulation de *ste11* par S2P est exclusive ou si elle est conservée seulement pour une classe de gènes. Trois catégories distinctes de gènes pourraient être distinguées dans ce dernier cas.
Catégorie 1 : les gènes possédant un pattern classique de S2P.
Catégorie 2 : les gènes possédant un niveau élevé mais non essentiel de S2P dans la région promotrice.
Catégorie 3 : les gènes dont le niveau élevé de S2P dans la région promotrice affecte fortement la transcription.
Dans les deux premières catégories, il semblerait que la S2P joue le rôle qui lui est habituellement assigné dans la littérature. Sa fonction n'est pas essentielle. Dans la troisième catégorie, la S2P joue un rôle crucial. Le seul exemple connu à ce jour appartenant à la catégorie 3 est le gène *ste11*.
Une hypothèse pour expliquer cette spécificité repose sur le fait qu'une expression aberrante de *ste11* aura des conséquences beaucoup plus larges que si, par exemple *pap1* ou *csx1* sont dérégulés. En effet, le choix inopiné de différentiation sexuelle affecte de façon profonde la vie cellulaire. D'un point de vue évolutif, ce sera *a fortiori* le cas si un pathway de différentiation est activé de manière inappropriée chez un organisme multi-cellulaire.

D'un point de vue moléculaire, il est possible que la levure possède une région de chromatine plus dense au niveau de *ste11*. Il a d'ailleurs été montré que les gènes impliqués en amont du pathway de la méiose chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) sont fortement régulés par des altérations de la chromatine telles que la désacétylation d'histones ou encore

le remodelage de celles-ci[46]. Ceci permet d'éviter plus facilement les transcriptions accidentelles de ces régions. Inférer qu'un même mécanisme soit présent chez *S. pombe* semble réaliste mais néanmoins à vérifier.
Si la chromatine est plus dense au niveau de *ste11*, elle sera moins accessible aux machineries de transcription. Par conséquent, il est possible qu'il faille plus d'enzymes pour desserrer l'étreinte des histones sur l'ADN afin d'assurer sa transcription. Il n'est donc pas exclu qu'il faille localement au niveau des régions 5' UTR un niveau de S2P élevé pour recruter, par exemple, plus de methyltransférase Set2.

Il a d'ailleurs été montré chez la levure *S. cerevisiae* que la délétion du gène *set2* provoquait une déficience de sporulation[47]. Or le même phénotype est visible chez la levure de fission *S. pombe* dans les mutants où la phosphorylation de la S2 est empêchée. Cette découverte va dans le sens de l'hypothèse développée ci-dessus. Il serait intéressant de tester la capacité à sporuler d'une souche délétée pour le gène *set2* chez *S. pombe* et de la comparer aux mutants S2A et *Δlsk1*.

b. ste11, un cas particulier ou un mécanisme de régulation à plus large échelle ?

Une très faible partie de gènes comprise dans les 115 ressortant de l'étude ChIP on chip a été observée de manière individuelle. C'est pourquoi il semble prématuré d'affirmer que *ste11* est ou n'est pas un cas particulier. Toutefois, il n'y a pas d'équivoque sur le cas de *ste11*. Cet exemple présente un gène dont la S2P joue un rôle majeur pour sa transcription. Un mécanisme de régulation génétique encore inconnu à ce jour affecte son expression. Il n'est dès lors pas à exclure que *ste11* fasse partie d'un ensemble plus vaste de gènes possédant une régulation particulière.

Il existe au sein du génome des régions plus facilement transcrites que d'autres. L'état de condensation de la chromatine joue certainement un rôle dans ce phénomène.
Si l'hypothèse évoquée au paragraphe précédent est correcte, il est possible que *ste11* se situe dans une région dense de la chromatine. Il lui faut donc plus de signal S2P afin de rendre sa transcription possible. Il est possible que ceci constitue un mécanisme original pour contrôler l'expression inopinée de gènes affectant fondamentalement la vie cellulaire.

7. Matériels et méthodes

a. Souches utilisées

Dans ce travail, les souches utilisées sont référencées via un numéro. Voici leur détail :

# souche	Génotype	Provenance
19	*h^+ ade6/ura4/leu1*	Reçu de B. Grallert
20	*h^- ade6/ura4/leu1*	Reçu de B. Grallert
94	*h^-*	Reçu de P. Nurse
375	*h^- ura4/leu1 sty1::ura4*	Reçu de T. Toda
376	*h^- ura4/leu1 pap1::ura4*	Reçu de T. Toda
461	*h^- ura4/leu1 lsk1::ura4*	Reçu de J. Karagiannis
468	*h^+ ade6/ura4/leu1 lsk1::ura4*	Stock
536	*h^+ ade6/ura4/leu1 rpb3-3HA-kanR*	Stock
552	*h^- rpb1 CTD S2A-kanR*	Stock
562	*h^+ rpb1 CTD S2A-kanR*	Stock
568	*h^{90}*	Stock
569	*h^{90} rpb1 CTD S2A-kanR*	Stock
581	*h^+ ura4 lsk1::ura4*	Stock
594	*h^- rpb3-HA-kanR*	Stock
596	*h^- rpb1 CTD S2A-kanR rpb3-HA-kanR*	Stock
597	*h^+ ura4 lsk1-HA-ura4*	Stock

b. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont les suivants :
YES (Yeast Extract Supplemented). Il s'agit d'un milieu riche.
ME (Malt Extract). Il s'agit d'un milieu pauvre en azote.
EMM Broth (Edinburgh Minimal Medium). Il s'agit d'un milieu minimal.
EMM Broth sans azote. Il s'agit d'un milieu minimal sans azote.
Tous ces milieux proviennent de la firme FORMEDIUM™.

Le YES, le ME, EMM-N et SPAS sont utilisés en combinaison avec de l'agar BD DIFCO™ qui joue le rôle d'agent solidifiant pour les tests sur boîtes.

c. Amorces utilisées lors des PCR

Voici les oligonucléotides utilisés pour l'étude de *ste11*, *pap1*, *pof14*, *csx1* et *zfs1*. Sont aussi référencés les oligonucléotides servant à amplifier les gènes de l'ARN 25S et *act1* servant de normalisateur dans les études de quantités relatives d'ARN.
Les lettres majuscules indiquent la présence de l'oligo au sein d'une ORF.

Gène	#	Séquence Forward 5'-->3'	Séquence Reverse 5'-->3'
ste11	1	gttggttgccaatgcgtatg	tacgacgcgaaacaattcaacg
ste11	2	ctttgtctctaccaccatagttatcc	ccaagcgatagaataacgatgcg
ste11	3	cttgagctggaaattccattagtttc	gtgacaaaagtatatttgatgccagg
ste11	4	TCGTCGAGATCGCCAAGC	GGCACTTTCATTTCTCCACAGC
ste11	5	GCCATACTTCTTACCCAGCAATG	CAGAATTGGTAACACTAGACGAAGAG
ste11	6	cgtatcaagcaatcatccaatgc	cattaccccagtaggtgtgg
pap1	0	aataccgtcagatgaatgtg	cttgcttggccttgtatcc
pap1	0bis	ctcgtattaactggatcgtc	cgataccacgagacttcttac
pap1	1	taattgcagatttgtacgtcttg	agcataacgcttacaaatcccag
pap1	1bis	cgcatattcaacgataacagc	gcctccattccgaaacatag
pap1	2	ttggtcttgctaatgctacg	ctcaagtatcgatcgcacttc
pap1	3	ATCTTCACGACGGACTTCATC	GGCTTAACATCGCCATCCAC
pap1	4	CGTCGAGTTGTCATTGAACG	ACCAGTATCGGTTGGCAATG
pap1	5	tagtcgatcaacaggaactcg	gtctcaatggatggaagctg
25S	/	TTGTCCATGAAATTCCATTGAA	CTTACAATACCCCGTTCCACAT
pof14	/	CTCTTGGTTATCGGAGCATGTTC	CACATAACTCAGCCAACTGC
act1	/	CTCAAAGCAAGCGTGGTATTT	TCTTTTCCATATCATCCCAGTTG
csx1	/	ACTGTTCTCCTAGCTCCACTC	CCTTGGATGGACGCTACTT
zfs1	/	CTCCTATGTCTCGACCTCAAG	GTGATCCCCTTGTCAACTCA

d. Coloration des spores à l'iode

Les croisements se font par mélange de deux souches de signes sexuels opposés (h^+ et h^-) sur milieu synthétique ME. Dans ces conditions, les souches arrêtent leur croissance en phase G1 du cycle cellulaire et conjuguent pour former un diploïde. La méiose suit immédiatement pour donner un asque à quatre spores ordonnées. Après deux jours, la présence des spores peut être vérifiée par observation microscopique ou révélée par coloration des spores à la vapeur d'iode (coloration due à la présence d'amidon). De la même sorte, les souches homothaliques h^{90} montrent le même potentiel. Une différence majeure réside dans le fait que les cellules h^{90} sont capables de changer de signe sexuel. Les colonies contiennent dès lors un mélange des populations h^+ et h^-. Elles sont donc auto-fertiles.

e. Microscopie

Les cellules observées au microscope à fluorescence sont d'abord colorées au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Pour ce faire, les cellules sont fixées dans de l'éthanol 70 % puis resuspendues dans du citrate de sodium 50 mM. Le DAPI est un colorant nucléaire qui permet de bien visualiser les noyaux lorsqu'une illumination UV est utilisée en combinaison avec un filtre DAPI. Une image est également observée avec une illumination à la lumière visible et un filtre Differential Interference Contrast (DIC).

f. Carence en azote

Le manque d'azote dans un milieu de culture est un stress déclenchant l'accumulation des cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire. Afin de passer d'un milieu azoté (EMM) à un milieu non-azoté (EMM–N), les cellules sont passées au travers d'un filtre dont la maille possède un diamètre de 0.8 μm. Ceci permet de laisser passer le milieu de culture tout en conservant les cellules. Ces dernières sont rincées par de l'EMM–N avec un volume équivalent à la culture. Les cellules sont ensuite resuspendues dans de l'EMM–N.

g. Induction au peroxyde d'hydrogène

Pour induire un stress oxydatif, du peroxyde d'hydrogène provenant de la firme Sigma® (Cat. :H1009) est ajouté à la culture. La solution stock est à une concentration de 8,82 M. Il convient donc de la diluer de façon appropriée afin d'obtenir la concentration désirée dans la culture.
Pour obtenir 100 ml de culture à une concentration en peroxyde d'hydrogène de 0.2mM, 22.6 μl de solution stock diluée 10 fois (0.88 M) sont ajoutés.
Pour obtenir 100 ml de culture à une concentration en peroxyde d'hydrogène de 1.0 mM, 113 μl de solution stock diluée 10 fois (0.88 M) sont ajoutés.
Si un volume plus grand est désiré, une règle de trois est appliquée.

h. FACS

Afin de vérifier l'arrêt en G1 des cellules, leur contenu en ADN est observé en cytométrie de flux. Pour ce faire, les cellules sont d'abord lavées à l'eau, fixées à l'éthanol et resuspendues dans du citrate de sodium 50 mM. Un traitement à la RNase A est enfin effectué afin d'éviter que l'ARN ne perturbe la mesure la mesure de la quantité d'ADN. Les cellules sont enfin mises en contact avec de l'iodure de propidium, un agent intercalant, qui va être excité lors de son passage dans le FACS.
Le FACS utilisé est de marque Becton Dickinson® et la mesure du contenu en ADN se fait via le canal FL2.

i. ChIP (Chromatin Immunoprecipitation)

i. Préparation de la chromatine

Les ChIP ont été réalisés selon les méthodes décrites par Aparicio et al.[48]. Une culture de 100 ml est suffisante pour obtenir suffisamment de chromatine pour permettre trois immunoprécipitations différentes. Lorsque les cellules ont atteint une DO_{595} comprise entre 0.6 et 0.8, elles sont fixées par l'ajout de 3 ml de formaldéhyde 37 % au milieu. Ceci a pour but de créer des liaisons covalentes entre les molécules et notamment entre l'ADN et les protéines associées.

S'ensuit une incubation de 10 minutes. Pour arrêter la liaison, 20 ml de glycine 2,5 M sont ajoutés. La chromatine est ensuite extraite. L'ADN est découpé en fragments de plus ou moins 500 pb à l'aide d'un sonicateur de type Bioruptor Diagenode™. Sept cycles à puissance maximale sont réalisés avec les réglages suivants : 30'' ON et 60'' OFF.

ii. Immunoprécipitation

Les anticorps suivants sont utilisés :
HA : Pour l'immunoprécipitation dirigée contre l'hémagglutinine (HA), une combinaison de deux anticorps est utilisée dans un rapport 1:1. Le premier est l'anticorps monoclonal HA.11 de type IgG provenant de la firme Covance®. Le second est l'anticorps monoclonal HA (F-7) : sc-7392 de type IgG provenant de la firme Santa Cruz®.
S2P : Pour l'immunoprécipitation dirigée contre la Ser phosphorylée en position 2 du CTD de la sous-unité Rpb1 de l'ARN polymérase II, l'anticorps monoclonal H5 de type IgM est utilisé. Il provient de la firme Covance®.
S5P : Pour l'immunoprécipitation dirigée contre la Ser phosphorylée en position 5 du CTD de la sous-unité Rpb1de l'ARN polymérase II, l'anticorps monoclonal H14 de type IgM est utilisé. Il provient de la firme Covance®.

Les isotypes de ces anticorps sont reconnus par des billes magnétiques Dynabeads™. Deux types de billes sont utilisés pour les IP. Des billes reconnaissant les IgG lors des IP avec des anticorps HA et des billes reconnaissant les IgM lors des IP S2P et S5P.

j. Purification d'ADN

L'ADN est purifié grâce au kit MSB Spin PCRapace de la firme Invisorb®. La solution contenant l'ADN est introduite dans une colonne de filtration avec 500 µl de tampon de fixation. Les tubes sont centrifugés pour éliminer les déchets. L'ADN purifié est récupéré par une double élution avec à chaque fois 25 µl de Tris 10 mM pH8.5.

k. q-PCR

Les PCR en temps réel sont réalisées avec du SYB® Green (Applied Biosystems™). Cet agent fluoresce après son intégration au sein d'un ADN double brin. La fluorescence est proportionnelle à la concentration en ADN double brin. Un appareil StepOne plus (Applied Biosystems™) permet de mesurer cette fluorescence et donc de quantifier l'ADN introduit dans la réaction. Les oligos de la région génique pour laquelle on souhaite obtenir des informations sont ajoutés au SYB® Green.
Les cycles de températures sont les suivants :
95°C pendant 15 secondes pour la phase de dénaturation ;
60°C pendant 1 minute pour les phases d'annealing et élongation.
L'ensemble de la réaction comporte 40 cycles.

l. Extraction d'ARN

Pour extraire de l'ARN, les cellules d'une culture de 50 ml à $DO_{595} \approx 0.4$ sont récoltées. Les cellules subissent différentes phases successives d'extraction au phénol-chloroforme. Ceci a pour but de dénaturer et de précipiter les protéines solubles. Elles se retrouvent à l'interface entre les phases organiques et aqueuses. L'ARN se situe dans la phase aqueuse. Si le pH est inférieur à 7.0, l'ADN sera également dénaturé et précipitera avec les protéines à l'interphase.

m. Purification d'ARN

L'ARN obtenu après extraction est ensuite purifié sur une colonne du kit RNeasy Qiagen™. 200 µg d'ARN extrait sont mélangés à 350 µl de tampon RLT (tampon de lyse). Ensuite 250 µl d'éthanol absolu sont ajoutés. Le mélange ainsi obtenu est transféré sur la colonne de filtration. La colonne est rincée deux fois avec du tampon RPE (solution de lavage). L'ARN est récupéré par élution avec 30 µl d'eau. Pour augmenter la concentration en ARN, ces 30 µl sont repassés dans la colonne une seconde fois.

n. RT-PCR

L'ARN purifié est rétro-transcrit en cDNA avec le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™). Ce kit possède des amorces aléatoires de petites tailles couvrant de manière équivalente la plupart du transcriptome. 2 µg d'ARN purifié sont insérés dans la réaction.
Les cycles de températures sont les suivants :
25°C pendant 10 minutes pour activer la reverse transcriptase ;
37°C pendant 120 minutes pour la réaction de rétrotranscription en elle-même ;
85°C pendant 5 minutes pour inactiver la reverse transcriptase.

8. Annexe

SPAC1142.06	SPAC110.01	SPAC3H1.08c	SPBC4B4.08
SPAC17D4.02	SPBP23A10.11c	SPAC2F3.09	SPAC9E9.09c
SPBC1271.09	SPCC645.06c	SPAC11E3.13c	SPBC13A2.04c
SPBC18H10.13	SPBC1347.14c	SPBC8D2.04	SPBC16D10.06
SPAC3H1.11	SPBC18H10.12c	SPAC1834.03c	SPCC1393.08
SPAC821.10c	SPBC1711.14	SPAC27E2.13	SPCC548.06c
SPAC1786.02	SPBC23E6.09	SPCC1393.10	SPBC530.10c
SPAC1834.04	SPAC21E11.03c	SPBC3H7.02	SPCC553.10
SPCC18.01c	SPCC757.12	SPAC1002.13c	SPAC10F6.01c
SPCC1902.01	SPBC646.12c	SPAC12G12.04	SPBC409.08
SPAC17A2.09c	SPAC1783.07c	SPCC13B11.01	SPAPB2B4.03
SPAC821.08c	SPAC24B11.12c	SPAC1705.03c	SPAC1A6.04c
SPCC1840.02c	SPCC1259.02c	SPBC1685.13	SPAPB15E9.01c
SPAC644.06c	SPCC830.07c	SPCC1672.02c	SPAPB1E7.07
SPBC32C12.02	SPBC409.07c	SPAC821.09	SPAC56F8.16
SPAC25B8.13c	SPAC25G10.08	SPBC1E8.05	SPAC631.02
SPCC16C4.07	SPBC4.07c	SPBC215.05	SPCC622.09
SPBC1D7.02c	SPAC1786.03	SPBC36.03c	SPCC736.15
SPBC1718.07c	SPAC4F10.13c	SPBC1105.05	SPBC3D6.02
SPCC594.02c	SPCC330.06c	SPBP4G3.02	SPCC1235.14
SPBC365.16	SPAC23H4.06	SPAC926.04c	SPBC1683.01
SPCC320.03	SPAC23D3.12	SPBC8E4.01c	SPBC1826.01c
SPAC644.05c	SPAC4F8.07c	SPBC56F2.12	SPBC337.08c
SPBC211.02c	SPAC806.11	SPAC23H3.13c	SPAC1639.01c
SPAC1071.10c	SPAC19B12.02c	SPAC26H5.08c	SPBC56F2.11
SPAC343.12	SPAC31G5.11	SPAC227.13c	SPBC2G5.06c
SPCC1281.06c	SPCC1739.13	SPBC30B4.01c	SPBC31A8.01c
SPAPB18E9.05c	SPAC8E11.10	SPAC110.04c	
SPCC18B5.01c	SPAPB8E5.03	SPCC417.15	
SPAC2H10.01	SPAC13G6.10c	SPAC16.05c	

Tableau 1 Gènes montrant un profil S2P élevé dans leur région 5' UTR

9. Bibliographie

1. Svejstrup, J. Q. The RNA polymerase II transcription cycle: cycling through chromatin. Biochim Biophys Acta 1677, 64-73 (2004).
2. Orphanides, G., Lagrange, T. & Reinberg, D. The general transcription factors of RNA polymerase II. Genes Dev 10, 2657-83 (1996).
3. Max, T., Sogaard, M. & Svejstrup, J. Q. Hyperphosphorylation of the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II facilitates dissociation of its complex with mediator. J Biol Chem 282, 14113-20 (2007).
4. Gu, X. The age of the common ancestor of eukaryotes and prokaryotes: statistical inferences. Mol Biol Evol 14, 861-6 (1997).
5. Corden, J. L. Tails of RNA polymerase II. Trends Biochem Sci 15, 383-7 (1990).
6. Akhtar, M. S. et al. TFIIH kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. Mol Cell 34, 387-93 (2009).
7. Bensaude, O. et al. Regulated phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain (CTD). Biochem Cell Biol 77, 249-55 (1999).
8. Palancade, B. & Bensaude, O. Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. Eur J Biochem 270, 3859-70 (2003).
9. Buratowski, S. The CTD code. Nat Struct Biol 10, 679-80 (2003).
10. Chapman, R. D., Heidemann, M., Hintermair, C. & Eick, D. Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. Trends Genet 24, 289-96 (2008).
11. Cho, E. J., Takagi, T., Moore, C. R. & Buratowski, S. mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. Genes Dev 11, 3319-26 (1997).
12. Komarnitsky, P., Cho, E. J. & Buratowski, S. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. Genes Dev 14, 2452-60 (2000).
13. Cho, E. J., Kobor, M. S., Kim, M., Greenblatt, J. & Buratowski, S. Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. Genes Dev 15, 3319-29 (2001).
14. West, M. L. & Corden, J. L. Construction and analysis of yeast RNA polymerase II CTD deletion and substitution mutations. Genetics 140, 1223-33 (1995).
15. Phatnani, H. P. & Greenleaf, A. L. Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. Genes Dev 20, 2922-36 (2006).
16. Ramanathan, Y. et al. Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences. J Biol Chem 276, 10913-20 (2001).
17. Karagiannis, J., Bimbo, A., Rajagopalan, S., Liu, J. & Balasubramanian, M. K. The nuclear kinase Lsk1p positively regulates the septation initiation network and promotes the successful completion of cytokinesis in response to perturbation of the actomyosin ring in Schizosaccharomyces pombe. Mol Biol Cell 16, 358-71 (2005).
18. Meinhart, A. & Cramer, P. Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3'-RNA-processing factors. Nature 430, 223-6 (2004).
19. Cadena, D. L. & Dahmus, M. E. Messenger RNA synthesis in mammalian cells is catalyzed by the phosphorylated form of RNA polymerase II. J Biol Chem 262, 12468-74 (1987).
20. Hausmann, S. & Shuman, S. Characterization of the CTD phosphatase Fcp1 from fission yeast. Preferential dephosphorylation of serine 2 versus serine 5. J Biol Chem 277, 21213-20 (2002).

21. Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C. & Hampsey, M. Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase. Mol Cell 14, 387-94 (2004).
22. Lehman, A. L. & Dahmus, M. E. The sensitivity of RNA polymerase II in elongation complexes to C-terminal domain phosphatase. J Biol Chem 275, 14923-32 (2000).
23. Cramer, P., Bushnell, D. A. & Kornberg, R. D. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. Science 292, 1863-76 (2001).
24. Meinhart, A., Kamenski, T., Hoeppner, S., Baumli, S. & Cramer, P. A structural perspective of CTD function. Genes Dev 19, 1401-15 (2005).
25. Vaquero, A., Loyola, A. & Reinberg, D. The constantly changing face of chromatin. Sci Aging Knowledge Environ 2003, RE4 (2003).
26. Ng, H. H., Robert, F., Young, R. A. & Struhl, K. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. Mol Cell 11, 709-19 (2003).
27. Krogan, N. J. et al. Methylation of histone H3 by Set2 in Saccharomyces cerevisiae is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. Mol Cell Biol 23, 4207-18 (2003).
28. Krogan, N. J. et al. The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. Mol Cell 11, 721-9 (2003).
29. Xiao, T. et al. Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast. Genes Dev 17, 654-63 (2003).
30. Hampsey, M. & Reinberg, D. Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. Cell 113, 429-32 (2003).
31. Coudreuse, D. et al. Sexual differentiation controlled by RNA polymerase II CTD phosphorylation on serine 2. Submitted (2009).
32. Ashburner M, B. C., Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. Nat Genet 25, 25-29 (2000).
33. Sugimoto, A., Iino, Y., Maeda, T., Watanabe, Y. & Yamamoto, M. Schizosaccharomyces pombe ste11+ encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. Genes Dev 5, 1990-9 (1991).
34. Kjaerulff, S., Andersen, N. R., Borup, M. T. & Nielsen, O. Cdk phosphorylation of the Ste11 transcription factor constrains differentiation-specific transcription to G1. Genes Dev 21, 347-59 (2007).
35. Quinn, J. et al. Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H(2)O(2) levels in fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Mol Biol Cell 13, 805-16 (2002).
36. Toone, W. M. et al. Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. Genes Dev 12, 1453-63 (1998).
37. Bozonet, S. M. et al. Oxidation of a eukaryotic 2-Cys peroxiredoxin is a molecular switch controlling the transcriptional response to increasing levels of hydrogen peroxide. J Biol Chem 280, 23319-27 (2005).
38. Kim, H. J., Jung, H. Y. & Lim, C. J. The pap1(+) gene of fission yeast is transcriptionally regulated by nitrosative and nutritional stress. FEMS Microbiol Lett 280, 176-81 (2008).
39. Rodriguez-Gabriel, M. A. et al. RNA-binding protein Csx1 mediates global control of gene expression in response to oxidative stress. Embo J 22, 6256-66 (2003).

40. Kanoh, J., Sugimoto, A. & Yamamoto, M. Schizosaccharomyces pombe zfs1+ encoding a zinc-finger protein functions in the mating pheromone recognition pathway. Mol Biol Cell 6, 1185-95 (1995).
41. Cuthbertson, B. J., Liao, Y., Birnbaumer, L. & Blackshear, P. J. Characterization of zfs1 as an mRNA-binding and -destabilizing protein in Schizosaccharomyces pombe. J Biol Chem 283, 2586-94 (2008).
42. Egel, R. Genes involved in mating type expression of fission yeast. Mol Gen Genet 122, 339-43 (1973).
43. Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. & Zumla, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes Immun 6, 279-84 (2005).
44. Tafforeau, L. et al. Repression of ergosterol level during oxidative stress by fission yeast F-box protein Pof14 independently of SCF. Embo J 25, 4547-56 (2006).
45. Fujii, Y., Shimizu, T., Toda, T., Yanagida, M. & Hakoshima, T. Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. Nat Struct Biol 7, 889-93 (2000).
46. Shimizu, M., Takahashi, K., Lamb, T. M., Shindo, H. & Mitchell, A. P. Yeast Ume6p repressor permits activator binding but restricts TBP binding at the HOP1 promoter. Nucleic Acids Res 31, 3033-7 (2003).
47. Morohashi, N., Mitchell, A. P. & Shimizu, M. Effect of histone methyltransferase gene mutations on sporulation in S. cerevisiae. Nucleic Acids Symp Ser (Oxf), 325-6 (2005).
48. Aparicio, O. et al. Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. Curr Protoc Mol Biol Chapter 21, Unit 21 3 (2005).