

Résumé de thèse en français

La terminaison de la transcription par roadblock

Au cours de ma thèse j'ai participé à mettre en évidence une nouvelle voie de terminaison de la transcription par l'ARN polymérase II (RNAPII) qui participe au contrôle de la transcription cachée (voir travaux antérieurs et Colin *et al*, 2014). Cette terminaison fait intervenir l'activateur transcriptionnel Reb1p et repose sur un mécanisme de roadblock : Reb1p lié à l'ADN constitue un obstacle pour les polymérases en cours d'élongation. La collision de la polymérase sur Reb1p induit un arrêt transcriptionnel qui est résolu par l'ubiquitylation et peut-être la dégradation de la polymérase. Les ARN ainsi libérés sont, comme les CUT, en partie polyadénylés par la poly(A)-polymérase Trf4p (probablement au sein du complexe TRAMP) et dégradés par l'exosome nucléaire. L'existence d'une pause transcriptionnelle fait que cette terminaison est associée à la détection d'espèces non polyadénylées relativement stables. En effet, l'extrémité 3' des ARN en cours de synthèse reste à l'intérieur de la polymérase pendant la pause transcriptionnelle, de ce fait, elle est inaccessible aux exonucléases. Les caractéristiques distinctives de la terminaison par roadblock sont donc l'occurrence d'une pause transcriptionnelle marquée et la génération de transcrits instables présentant une extrémité 3' bien définie qui sont en partie non adénylés. Cette voie est utilisée pour terminer des ARN non codants que nous avons nommés RUTs (Reb1p-dependent Unstable Transcripts) du fait de leur similarité avec les CUT

(polyadénylation par Trf4p et dégradation par l'exosome nucléaire). Elle est également employée pour neutraliser la transcription readthrough c'est-à-dire les événements de transcription d'un ARNm qui se prolongent au-delà du terminateur. Ceci permet de protéger les régions régulatrices d'autres gènes contre l'invasion par des événements transcriptionnels dérivant des gènes voisins (voir travaux).

Dans un génome compact et hautement transcrit tel que celui de *S. cerevisiae*, il est indispensable de gérer la cohabitation entre transcription fonctionnelle (produisant par exemple des ARNm) et transcription « envahissante » (due par exemple à des défauts de terminaison ou des initiations inappropriées). La terminaison de la transcription par roadblock, par ses caractéristiques, joue un rôle important dans ce mécanisme de contrôle. En effet, elle requiert peu d'information pour arrêter une polymérase (un site de liaison à l'ADN pour une protéine) et elle est induite par d'autres facteurs que Reb1p, chose que j'ai aussi participé à démontrer. En revanche, elle conduit à la dégradation du transcrit ainsi terminé et très probablement de la polymérase, ce qui représente un certain coût énergétique. Cependant, ce coût est très probablement justifié par sa fonction dans le contrôle de la qualité transcriptionnelle et par le fait que le mécanisme utilisé soit simple et économique d'un point de vue évolutif. De plus, la terminaison de la transcription par roadblock pourrait être un mécanisme mis en jeu non seulement pour protéger les promoteurs des ARNm mais pourrait également protéger d'autres structures qui doivent être mises à l'abri d'une invasion par des polymérases.

Mécanisme de la terminaison de la transcription par roadblock

La première étape d'une tentative de résolution d'un arrêt transcriptionnel fait intervenir le facteur général d'élongation TFIIIS. En effet, les polymérases commencent par reculer, et l'extrémité 3' de l'ARN en cours de synthèse se retrouve ainsi déplacée hors du site catalytique. TFIIIS stimule le clivage de cet ARN par RNAPII afin de repositionner l'extrémité 3' au niveau du site catalytique. Si cela ne suffit pas à résoudre l'arrêt, alors la grande sous-unité de la polymérase, Rpb1p, est ubiquitinylée. Cela nécessite l'action séquentielle des ubiquitine ligases Rsp5p et Elc1p-Cul3p. Rsp5p réalise la mono-ubiquitylation de Rpb1p puis un complexe comprenant Elc1p et Cul3p catalyse l'allongement de la chaîne de polyubiquitine. A cette étape, cette polyubiquitylation est réversible par l'action de la déubiquitinase Ubp3p. Il est admis que toutes ces étapes sont réalisées au site d'arrêt de la polymérase, sur le complexe ternaire RNAPII-ADN-ARN. Rpb1p est ensuite dégradée par le protéasome qui pourrait être recruté au site d'arrêt. Cette dégradation nécessite l'intervention de l'ATPase Cdc48p. En effet, la sous-unité ubiquitinylée doit être désassemblée de l'holoenzyme pour pouvoir être suffisamment dénaturée afin d'être dégradée par le protéasome. Cdc48p prend en charge cette étape.

Cette dissection de la résolution de l'arrêt transcriptionnel a principalement été réalisée dans le cadre de lésions au niveau de l'ADN (pour revue voir Wilson *et al*, 2013). Dans le cas d'un arrêt de la transcription dû à un événement de roadblock, nous avons déterminé que les ubiquitine ligases Rsp5p et Cul3p intervenaient. Cependant, le mécanisme précis de libération de la polymérase et les facteurs impliqués ne sont pas connus. Par exemple, nous n'avons pas déterminé si la polymérase est toujours dégradée ou

si son inactivation par ubiquitinylation est réversible. Ces questions relatives au mécanisme de résolution de l'arrêt transcriptionnel dû à un roadblock sont importantes et seront adressées dans la laboratoire.

Identification d'autres facteurs capables de terminer la transcription par un mécanisme de roadblock

Il est clair que tous les facteurs de transcription ne sont pas des roadblockers. Reb1p lie son site avec une bonne affinité (de l'ordre de 70nM). Compte-tenu du mécanisme mis en jeu, on pourrait imaginer que tout facteur ayant une affinité suffisante pour son site soit capable de réaliser de la terminaison par roadblock. Cependant, ce n'est pas le cas. En effet, Gal4p lie également son site avec une bonne affinité mais ne semble pas capable de terminer la transcription par roadblock (Greger & Proudfoot, 1998; Porrua *et al*, 2012).

J'ai contribué à Identifier d'autres facteurs capables d'induire la terminaison de la transcription par roadblock ce qui a permis également d'avoir une vision plus claire de l'étendue du processus de son rôle protecteur.

Rap1p et Abf1p sont des facteurs de roadblock

Nous avons identifié deux candidats. Le premier, Rap1p, est, comme Reb1p, un facteur de transcription essentiel et abondant de la famille Myb-like. L'éventualité d'un rôle de Rap1p comme facteur de terminaison selon un mécanisme de roadblock avait déjà été évoquée, cependant ces travaux ne permettait pas d'affirmer que le mécanisme était bien du roadblock

et surtout, aucune piste n'était avancée concernant le rôle physiologique de cette terminaison (Yarrington *et al*, 2012). Les travaux réalisés dans notre laboratoire permettent de confirmer un rôle de Rap1p dans la terminaison et soutiennent un mécanisme de terminaison par roadblock. Un cas similaire est le facteur Abf1p/Reb2p. Ce facteur de transcription possède également un rôle dans la réplication et il lie de nombreuses origines de réplication. Comme dans le cas de Rap1p, nous avons montré l'existence d'une pause transcriptionnelle en amont du site de liaison d'Abf1p. D'autres arguments issus de la littérature indiquent qu' Abf1p pourrait fonctionner comme un facteur de roadblock (Valerius *et al*, 2002). L'étude de l'impact à l'échelle du génome de la terminaison dépendante de Rap1p et Abf1p est décrite dans le manuscrit.

Puisque Rap1p et Abf1p sont tous les deux des facteurs de transcription, leurs sites de liaison sont souvent localisés dans des promoteurs. Ils pourraient donc, comme Reb1p, participer à la protection de ces promoteurs d'une extinction par interférence transcriptionnelle.

Autres cas potentiels de « roadblockers »

Les promoteurs utilisés par l'ARN polymérase III (RNAPIII) présentent certaines similarités avec les promoteurs contenant des sites Reb1p, Rap1p ou Abf1p. En effet, il avait été montré que le facteur d'initiation de la transcription par RNAPIII TFIIC joue, comme les facteurs Reb1p, Rap1p et Abf1p, un rôle de séparateur vis-à-vis de l'hétérochromatine (Fourel *et al*, 2002; Simms *et al*, 2008).

Il a été récemment montré que le promoteur d'un ARNt (transcrit par RNAPIII) peut se comporter comme un terminateur vis-à-vis de la transcription par RNAPII (Korde *et al*, 2014). Les auteurs ont montré que l'extinction du gène situé en aval (*CIS1*) par interférence transcriptionnelle n'était pas sensible aux facteurs de remodelage de la chromatine, comme c'est le cas pour la terminaison roadblock par Reb1p. En revanche, les facteurs d'initiation de la transcription par RNAPIII, en particulier TFIIIB, sont requis. Cette étude ne porte que sur un locus et ne fait pas la preuve d'une terminaison par roadblock. Cependant le locus étudié présente une accumulation précise d'extrémités 3' de transcrits instables (Neil *et al*, 2009) ainsi que de la pause transcriptionnelle (Churchman & Weissman, 2011) ce qui est tout à fait compatible avec une terminaison par roadblock. J'ai étendu mes analyses génomiques aux tRNAs et démontré que le roadblock a bien lieu en 5' et en 3' des tRNAs.

Enfin, les origines de réplication (ARS) sont réputées silencieuses et cette absence de transcription est nécessaire à leur fonction. Nos études montrent que les ARS sont capables de se comporter comme des terminateurs vis-à-vis de la transcription par RNAPII. Cette terminaison pourrait être provoquée par un mécanisme de roadblock puisqu'elle semble précise, bidirectionnelle et que les espèces terminées présentent des extrémités polyA(+) et polyA(-) caractéristique que l'on observe au niveau des transcrits terminés par un mécanisme de roadblock. Le facteur à l'origine de cette terminaison reste à identifier. En effet, il ne s'agit *a priori* d'Abf1p (qui est présent dans un certain nombre d'ARS dont *ARS1*) et pourrait être le complexe de liaison de l'origine de réplication (ORC). La terminaison de la transcription par roadblock au niveau des origines de réplication pourrait avoir un rôle dans la protection de

l'activité de ces ARS. Mes analyses suggèrent que cette « protection » a un impact important sur la fonction des origines de réplication.

Pour générer les données d'analyse transcriptionnelle à l'échelle génomique, nous avons utilisé la technique du CRAC (crosslink and cDNA analysis). Le CRAC consiste à réaliser un pontage covalent aux UV entre protéines et ARN et à purifier en deux étapes, dont une dénaturante, la polymérase (Bohnsack *et al*, 2012; Granneman *et al*, 2009). Cette technique a été utilisée pour générer les données que j'ai analysé. Le CRAC a été utilisé pour analyser les sites de pause de la polymérase (l'un des indicateurs caractéristiques de la terminaison par roadblock) et sa distribution dans des mutants de terminaison.

L'étude de données de CRAC obtenues en absence de nos roadblockers a permis de détecter le défaut de terminaison à l'échelle du génome avec la disparition de la pause transcriptionnelle due à ces facteurs et l'apparition de « reads » en aval du site de terminaison.

Ces défauts de terminaison sont susceptibles d'altérer l'expression de gènes voisins. Lors de nos études, l'utilisation d'une forme tronquée de Rap1p permettant de terminer mais pas d'activer la transcription nous a permis de discriminer quels gènes étaient sous-exprimés du fait d'un événement d'interférence transcriptionnelle (voir Figure 5).

Analyse de la terminaison secondaire

L'étude de la terminaison par Reb1p et Rap1 nous a permis de mettre à jour un rôle majeur de cette voie de terminaison comme mécanisme de secours pour palier aux défauts d'efficacité de terminateurs d'un autre type, en l'occurrence des terminateurs d'ARNm, donc dépendants du complexe de terminaison CPF-CF. Lorsque le roadblock induit par Reb1p est utilisé pour neutraliser les fuites d'un terminateur primaire, ces fuites sont relativement faibles. Il est donc délicat de visualiser clairement un pic de pause transcriptionnelle. Pour visualiser par CRAC les événements de terminaison secondaire, il a été donc nécessaire d'accroître ces fuites. Pour cela, nous avons inactivé indépendamment différentes voies de terminaison primaires (CPF-CF, NNS, roadblock par Reb1p/Rap1p...) à l'aide du système anchor away ou des mutants (Haruki *et al*, 2008). Le système anchor away consiste à délocaliser le facteur d'intérêt du compartiment cellulaire dans lequel il agit (dans notre cas le noyau) vers un autre (le cytoplasme). Le système anchor away fonctionne très rapidement ce qui permet d'éliminer du noyau le facteur d'intérêt dans des délais suffisamment courts pour limiter les effets indirects. De plus, l'utilisation de ce mode d'inactivation a déjà fait ses preuves quant à l'étude de la terminaison de la transcription (Schaughency *et al*, 2014; Schulz *et al*, 2013).

L'inactivation des voies de terminaison primaires permet la poursuite de l'élongation jusqu'à l'éventuel site de roadblock localisé en aval. Cet afflux de polymérases, en augmentant localement la transcription en amont du site de roadblock utilisé comme terminateur secondaire, a permis de faciliter la détection des pics de pause associés (nous définissons les pics de pause par rapport à la moyenne locale de la transcription). Cette étude

nous a permis d'avoir une vision plus claire de l'importance de la terminaison par roadblock comme mécanisme de secours.

Régulation de et par la terminaison de la transcription par roadblock

Comme pour la terminaison dépendant du complexe NNS, il pourrait exister des cas de régulation par roadblock conditionnel. Cela pourrait être le cas de facteurs capables de réaliser de la terminaison par roadblock mais qui ne sont exprimés (ou suffisamment exprimés) que dans certaines conditions physiologiques (comme par exemple Hsf1p en cas de choc thermique). De même, des sites de liaison de facteurs de roadblock pourraient dans certaines conditions être inaccessibles du fait de l'encombrement stérique d'autres facteurs ou plus simplement du fait de la présence d'un nucléosome. Il sera intéressant dans le futur de détecter ces cas de roadblock conditionnels en réalisant des expériences de CRAC sur des cellules cultivées dans différentes conditions de milieu, de température.

Bibliographie

- Bohnsack MT, Tollervey D & Granneman S (2012) Identification of RNA helicase target sites by UV cross-linking and analysis of cDNA. *Meth. Enzymol.* **511**: 275–288
- Churchman LS & Weissman JS (2011) Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature* **469**: 368–373
- Colin J, Candelli T, Porrua O, Boulay J, Zhu C, Lacroute F, Steinmetz LM & Libri D (2014) Roadblock termination by reb1p restricts cryptic and readthrough transcription. *Mol. Cell* **56**: 667–680

- Fourel G, Miyake T, Defossez P-A, Li R & Gilson E (2002) General regulatory factors (GRFs) as genome partitioners. *J. Biol. Chem.* **277**: 41736–41743
- Granneman S, Kudla G, Petfalski E & Tollervey D (2009) Identification of protein binding sites on U3 snoRNA and pre-rRNA by UV cross-linking and high-throughput analysis of cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 9613–9618
- Greger IH & Proudfoot NJ (1998) Poly(A) signals control both transcriptional termination and initiation between the tandem GAL10 and GAL7 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**: 4771–4779
- Haruki H, Nishikawa J & Laemmli UK (2008) The anchor-away technique: rapid, conditional establishment of yeast mutant phenotypes. *Mol. Cell* **31**: 925–932
- Korde A, Rosselot JM & Donze D (2014) Intergenic transcriptional interference is blocked by RNA polymerase III transcription factor TFIIIB in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **196**: 427–438
- Neil H, Malabat C, d'Aubenton-Carafa Y, Xu Z, Steinmetz LM & Jacquier A (2009) Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature* **457**: 1038–1042
- Porrua O, Hobor F, Boulay J, Kubicek K, D'Aubenton-Carafa Y, Gudipati RK, Stefl R & Libri D (2012) In vivo SELEX reveals novel sequence and structural determinants of Nrd1-Nab3-Sen1-dependent transcription termination. *EMBO J.* **31**: 3935–3948
- Schaughency P, Merran J & Corden JL (2014) Genome-wide mapping of yeast RNA polymerase II termination. *PLoS Genet.* **10**: e1004632
- Schulz D, Schwalb B, Kiesel A, Baejen C, Torkler P, Gagneur J, Soeding J & Cramer P (2013) Transcriptome surveillance by selective termination of noncoding RNA synthesis. *Cell* **155**: 1075–1087
- Simms TA, Dugas SL, Gremillion JC, Ibos ME, Dandurand MN, Toliver TT, Edwards DJ & Donze D (2008) TFIIIC binding sites function as both heterochromatin barriers and chromatin insulators in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **7**: 2078–2086
- Valerius O, Brendel C, Düvel K & Braus GH (2002) Multiple factors prevent transcriptional interference at the yeast ARO4-HIS7 locus. *J. Biol. Chem.* **277**: 21440–21445

Wilson MD, Harreman M & Svejstrup JQ (2013) Ubiquitylation and degradation of elongating RNA polymerase II: the last resort. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**: 151–157

Yarrington RM, Richardson SM, Lisa Huang CR & Boeke JD (2012) Novel transcript truncating function of Rap1p revealed by synthetic codon-optimized Ty1 retrotransposon. *Genetics* **190**: 523–535