

1 TABLE DES MATIERES

Remerciements	7
1 Table des matières.....	9
2 Table des illustrations	11
3 Abréviations	13
4 Avant propos	15
5 Introduction	17
5.1 Facteurs de transcription et contexte chromatinien	17
5.1.1 Les facteurs de transcription.....	17
5.1.2 Architecture de la chromatine.....	20
5.2 Transcription	34
5.2.1 Initiation	34
5.2.2 Élongation	50
5.2.3 Terminaison	53
5.3 Le Médiateur de la régulation transcriptionnelle	55
5.3.1 Découverte	55
5.3.2 Structure et organisation	56
5.3.3 Fonction dans l'initiation de la transcription.....	63
5.3.4 Autres fonctions.....	66
5.3.5 Implication dans les maladies	69
5.4 RSC/PBAF.....	74
5.4.1 RSC chez <i>S. cerevisiae</i>	74
5.4.2 PBAF chez les mammifères.....	78
5.4.3 Processus de remodelage.....	82
5.4.4 Fonction dans la transcription.....	83
5.4.5 Autres fonctions.....	89
5.4.6 Implication dans les maladies	89
6 Résultats	92
6.1 Contexte de travail.....	92
6.2 Article	97
6.3 Résultat supplémentaire – Interaction physique entre le Médiateur et les complexes BAF/PBAF dans les cellules humaines.....	98
7 Discussion et perspectives	102
7.1 Interaction physique entre le Médiateur et RSC.....	102
7.2 Effets des mutations du Médiateur sur l'occupation des complexes et l'organisation des promoteurs.....	103
7.3 Différences d'occupation entre Sth1 et Rsc8 dans les mutants du Médiateur.....	106
7.4 Nucleosomes fragiles	108
7.5 NDR larges et GRF	108
7.6 RSC et le Médiateur dans le positionnement stable du nucléosome +1	109
7.7 Le Médiateur et RSC dans l'organisation tridimensionnelle du génome	110
7.8 Fonctions au-delà de l'initiation de la transcription.....	111

7.9	Conservation dans les cellules humaines	112
7.10	Conclusion générale.....	112
8	Références.....	114
9	Annexe.....	159
9.1	Revue	159

2 TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Caractéristiques des FT (Héberlé et Bardet, 2019).....	19
Figure 2. Représentation schématique des CID/TAD dans le noyau (figure originale).	22
Figure 3. Structure d'un nucléosome vu d'en haut (Yan et Chen, 2020).	25
Figure 4. Représentation schématique d'un promoteur proximal (figure originale)	32
Figure 5. Structure des sous-unités catalytiques des remodeleurs de la chromatine (Clapier et Cairns, 2009).	36
Figure 6. Visualisation de la structure de la Pol II (Schier et Taatjes, 2020).	43
Figure 7. Architecture du Médiateur : carte de densité des trois modules principaux (adapté de Robinson et al., 2015).	60
Figure 8. Interaction fonctionnelle entre l'enhanceur et le promoteur proximal (figure originale).....	64
Figure 9. Composition des sous-unités de RSC (Wagner et al., 2020).	75
Figure 10. Architecture de RSC (Wagner et al., 2020).	76
Figure 11. Structure de PBAF lié au nucléosome (Yuan et al., 2022). .	80
Figure 12. Structure du SRM de PBAF (Yuan et al., 2022).....	81
Figure 13. Représentation des mécanismes de diffusion de torsion (a) et de propagation de boucle (b) (Bowman, 2010).	82
Figure 14. Modèle actuel de remodelage par RSC (Lorch et Kornberg, 2017).	84
Figure 15. Représentation simplifiée de la formation d'une NDR par RSC/PBAF (figure originale)	87
Figure 16. Le Médiateur interagit avec les complexes BAF dans les cellules humaines.	99
Figure 17. Structure de Med17 chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	103
Figure 18. Structure de Rsc8 chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	104

Tableau 1. Les variants d'histones impliqués dans la régulation de la transcription (adapté de Li et al., 2007).....	26
Tableau 2. Modifications d'histones associées à la transcription (adapté de Li et al., 2007).	28
Tableau 3. Composition des remodeleurs de la chromatine (adapté de Clapier and Cairns, 2009).....	38
Tableau 4. Sous-unités de la Pol II et leurs fonctions.	44
Tableau 5. GTF et leurs fonctions.	48
Tableau 6. Sous-unités du Médiateur.	58
Tableau 7. Implications dans les maladies des sous-unités du Médiateur (Spaeth et al., 2011).	69
Tableau 8. Sous-unités de PBAF et leurs différents noms les plus communs.....	81

3 ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNnc : ARN non codant
BAF : *BRG1-associated factors*, facteurs associés à BRG1
CID : *chromosomal interaction domain*, domaine d'interactions chromosomiques
ChIP-seq : immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage
ChIP-qPCR : immunoprécipitation de la chromatine suivie d'une PCR
CoIP : co-immunoprécipitation
FT : facteur de transcription
GTF : *general transcription factor*, facteur général de transcription
GRF : *general regulatory factor*, facteur régulateur général
IDR : *intrinsically disordered region*, région désordonnée intrinsèque
LSH : localisation superhélicoïdale
MC : modificateur de la chromatine
NER : *nucleotide excision repair*, réparation par excision de nucléotide
PIC : *preinitiation complex*, complexe de pré-initiation
PTM : *post-translational modification*, modification post-traductionnelle
pb : paires de bases
Pol II : ARN polymérase II
NDR : *nucleosome-depleted region*, région appauvrie en nucléosomes
RC : remodeleur de la chromatine
RSC : *remodels the structure of chromatin*
UAS : *upstream activating sequence*, séquence activatrice d'amont
TAD : *topologically associating domains*, domaine d'association topologique
TAF : *TBP-associated factors*, facteurs associés à TBP
TBP : *TATA-binding protein*, protéine liant la boîte TATA
TSS : *transcription start site*, site de début de la transcription

4 AVANT PROPOS

Les cellules sont les unités de base qui composent les organismes multicellulaires que nous sommes. Elles sont constamment en contact avec leur environnement péricellulaire et échangent avec lui de sorte à adapter leur physiologie interne à toute perturbation ou changement. Ce faisant, elles maintiennent une bonne homéostasie cellulaire et empêchent l'apparition de processus biologiques inappropriés qui pourraient mener à des états cellulaires pathologiques.

Les cellules échangent avec l'environnement grâce à des récepteurs membranaires. Des ligands extracellulaires viennent s'y lier et déclenchent l'activation ou la répression de différentes voies de signalisations intracellulaires. La dynamique de ces voies peut se traduire par une cascade de modifications post-traductionnelles, qui aboutit à un changement du programme d'expression génique dans le noyau. Le terme « expression génique » regroupe en fait différents procédés finement régulés qui permettent à la cellule de maintenir son homéostasie. La transcription des gènes est l'un d'eux : c'est un processus essentiel pour la cellule qui permet la synthèse d'acides ribonucléiques (ARN) à partir d'une lecture de l'acide désoxyribonucléique (ADN).

Les gènes sont les unités basiques physiques et fonctionnelles de l'information génétique. Il y en a de différentes sortes en fonction du type de régulation dont ils bénéficient et du type d'ARN que leur transcription génère. Ces ARN sont différents en termes de structure et de fonction. La transcription des gènes codant pour les protéines produit des ARN messagers (ARNm) qui sont destinés à être traduits. A l'inverse, les gènes qui ne codent pas pour les protéines produisent des ARN dits « non codants ». On trouve dans cette catégorie des ARN de transfert et des ARN ribosomaux (les deux types sont utiles à la traduction des ARNm), des petits ARN interférents et des microARN impliqués dans le phénomène d'ARN interférence, des petits ARN nucléolaires qui régulent l'activité des autres ARN, des petits ARN nucléaires qui participent à la maturation des ARN pré-

messagers, des longs ARN qui en regroupent différents types et qui sont capables de réguler d'autres ARN ainsi que des processus nucléaires.

La transcription implique un très grand nombre de protéines régulatrices. Premièrement, les facteurs de transcription (FT) : ils sont à la fin des cascades des voies de signalisation et permettent *in fine* de transmettre un message d'adaptation venant du milieu extracellulaire ou intracellulaire au noyau de la cellule. Ils transmettent notamment ce message au Médiateur, à RSC, et à d'autres corégulateurs protéiques afin qu'ils initient la transcription de gènes cibles. Le rôle particulier du Médiateur est de transmettre les signaux des FT à la machinerie transcriptionnelle, responsable de la transcription *per se*. Ainsi, la transcription de gènes spécifiques débute et amène à la production d'ARN qui seront utilisés pour le maintien de la physiologie cellulaire, dont les ARNm qui seront traduits plus tard en protéines, qui seront elles-mêmes maturées et exportées vers leur site d'action physiologique.

C'est de cette manière que les cellules communiquent et restent fonctionnelles dans les organismes multicellulaires, et que les organismes unicellulaires s'adaptent et survivent dans leur environnement. Cependant, lorsque des dysfonctions apparaissent dans la régulation de la transcription, elles provoquent l'apparition de maladies graves comme des troubles du développement et des cancers. Comprendre les mécanismes moléculaires de ce processus et les protéines impliquées dans sa régulation permettra de comprendre ses dysfonctionnements, de sorte que nous puissions utiliser ces connaissances dans le futur pour traiter les maladies associées.

5 INTRODUCTION

Durant la thèse, je me suis intéressé à un type de transcription en particulier qui est la transcription médiée par l'ARN polymérase II (Pol II). Ce complexe enzymatique gère notamment la transcription des gènes codants les protéines. Dans l'introduction, le processus transcriptionnel et ses régulateurs sont présentés en suivant une séquence biologique possible d'activation du gène, depuis l'activation du FT jusqu'à la production de l'ARNm.

On peut considérer que la transcription s'initie toujours par un FT. Il peut stationner dans le cytoplasme en attendant d'être activé par les protéines situées en amont de lui dans une cascade de signalisation, puis après son activation (qui peut se traduire par une modification post-traductionnelle), migrer dans le noyau pour transmettre le signal d'adaptation aux régulateurs transcriptionnels. Il peut aussi être lié directement par un ligand dans le cytoplasme pour que sa migration soit déclenchée, ou encore être activé directement dans le noyau. Quoi qu'il en soit, il est indispensable à l'initiation de la transcription, et c'est lui en premier lieu qui cible le gène à activer ou réprimer.

5.1 FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET CONTEXTE CHROMATINIEN

5.1.1 Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription (FT) sont des protéines capables de lier l'ADN de manière spécifique, dont le rôle est de réguler les programmes d'expression génique cellulaire. Ils peuvent diriger la différenciation cellulaire, la dé-différenciation et même la trans-différenciation, et des mutations qui les touchent sont à la base de nombreuses maladies (Lambert et al., 2018).

Environ 183 FT sont connus chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Monteiro et al., 2020) et 1600 sont connus chez l'homme. La plupart de ces derniers sont conservés chez les eucaryotes

(Morgan and Shilatifard, 2020). Ils peuvent être classés dans plusieurs familles selon le type des deux différents domaines principaux qui les composent : le domaine de liaison à l'ADN (100 types différents connus chez les eucaryotes) et le domaine d'activation (qui permet les interactions avec les autres régulateurs transcriptionnels). Chez les organismes pluricellulaires, certains FT sont ubiquitaires et actifs partout, certains sont ubiquitaires mais non actifs dans chaque cellule et d'autres sont spécifiques à un type cellulaire. C'est le cas par exemple de SOX2 qui n'est exprimé que dans le cerveau ou encore de GATA4 qui n'est exprimé que dans le cœur (Lambert et al., 2018).

Le rôle des FT est de réguler l'initiation de la transcription de gènes cibles en recrutant des corégulateurs spécifiques (Schier and Taatjes, 2020). Pour ce faire, ils lient des motifs spécifiques, uniques à chaque FT, qui peuvent se situer sur l'ADN nu ou sur l'ADN enroulé autour d'un nucléosome, dit alors « ADN nucléosomal ». Les FT qui lient l'ADN nucléosomal sont moins fréquents et sont nommés « facteurs pionniers ». Ils sont fréquemment impliqués dans l'amorçage d'un phénomène de remodelage de la chromatine. Il est à noter qu'un même FT peut avoir différentes fonctions selon le contexte et le type cellulaire.

Les motifs des FT sont petits (environ 6 à 12 bases) et flexibles. Les FT peuvent les lier de différentes manières en fonction du contexte. En effet, l'état de la chromatine influence la liaison : c'est le cas par exemple de la méthylation de l'ADN et de l'obstruction du motif par un nucléosome, qui inhibent cette liaison. Les FT peuvent également coopérer les uns avec les autres : ils peuvent lier l'ADN en tant qu'homodimères, trimères ou même encore d'autres structures d'un ordre plus avancé. Ils peuvent notamment agir en synergie avec d'autres FT, surtout chez les humains. Par exemple, la liaison d'un FT sur son motif peut changer la forme de l'ADN ou la conformation du nucléosome associé. Elle peut aussi amorcer le déplacement d'un nucléosome par un remodeleur de la chromatine (les FT pionniers), ce qui permet la libération d'un second motif de fixation (figure 1) (Héberlé and Bardet, 2019).

Le recrutement des corégulateurs est le principal mode de régulation de la transcription par les FT. Cependant, ils peuvent aussi agir en obstruant des sites de liaisons d'autres protéines, les

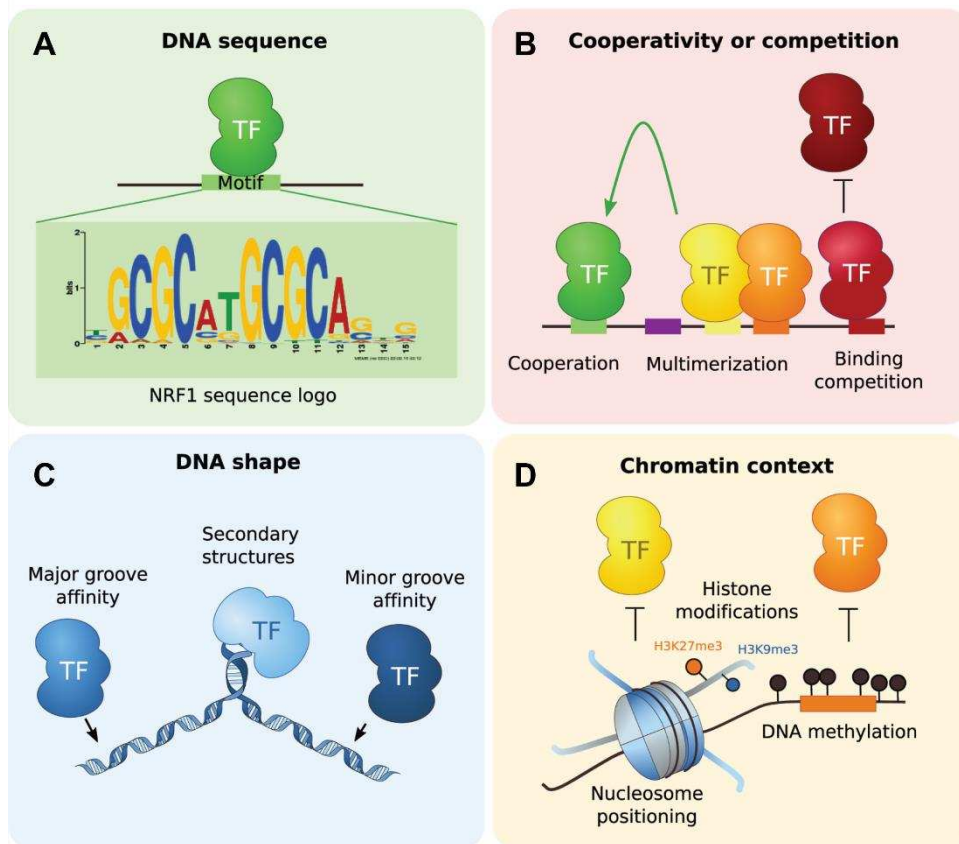


Figure 1. Caractéristiques des FT (Héberlé et Bardet, 2019).

(A) Les FT se lient sur l'ADN via la reconnaissance de motifs spécifiques. (B) Les FT peuvent coopérer ou entrer en compétition pour la liaison sur l'ADN. La liaison d'un FT peut stimuler (gauche) ou inhiber (droite) la liaison d'un second. Ils peuvent former des multimères pour coopérer (centre). (C) Les FT peuvent avoir une affinité plus grande pour certaines conformations d'ADN : le grand sillon (gauche), le petit sillon (droite) ou des structures secondaires (centre). (D) Le contexte chromatinien régule la liaison des FT à l'ADN : la méthylation de l'ADN et l'obstruction d'un motif par un nucléosome peuvent inhiber cette liaison. TF : transcription factor.

empêchant ainsi d'agir sur le gène (Lambert et al., 2018). Ils peuvent aussi interagir directement avec des facteurs de la machinerie transcriptionnelle et des facteurs d'élongation, sans passer par un corégulateur intermédiaire comme le Médiateur. C'est par exemple le

cas des FT MYC et BRD4 chez l'homme : MYC peut interagir directement avec la Pol II et stimuler sa libération de l'ADN suite à un arrêt (Rahl et al., 2010), tandis que BRD4 peut recruter le facteur d'élongation P-TEFb pour stimuler la reprise de la Pol II suite à son arrêt à proximité du promoteur (Li et al., 2018). De la même manière, chez la levure, le FT Gcn4 interagit directement avec la Pol II et Gal4 interagit directement avec TBP, TFIIB et SAGA (Brandl and Struhl, 1989; Klein et al., 2003; Wu et al., 1996).

Les FT n'agissent pas toujours comme des activateurs transcriptionnels. Ils peuvent en effet agir comme répresseurs et recruter des régulateurs négatifs (Lambert et al., 2018). Un même FT peut être à la fois activateur et répresseur selon le contexte. C'est le cas par exemple du FT Leu3 chez la levure qui est activateur ou répresseur en fonction du gène cible (Kohlhaw, 2003). Chez les mammifères, c'est le cas de MAX qui agit en activateur quand il est associé à MYC, et en répresseur quand il est associé à MNT ou MXD1 (Amati and Land, 1994).

Les motifs cibles des FT sont répartis partout sur l'ADN dans le noyau, et sont noyés dans une masse d'autres informations. Heureusement, l'ADN est structurellement et fonctionnellement organisé, ce qui permet au FT de localiser plus efficacement sa cible.

5.1.2 Architecture de la chromatine

Dans le noyau, l'ADN est compacté de sorte que les cellules puissent contenir une énorme quantité d'information génétique. En effet, l'ADN est enroulé autour de protéines appelées « histones », et forme avec elles une structure qu'on appelle « nucléosome ». On parle de « chromatine » quand on fait référence à l'ADN plus toutes les protéines qui y sont liées.

Le degré de compaction n'est pas homogène partout dans le noyau : certaines régions sont plus compactées que d'autres et *vice versa*. Les régions les plus compactées sont définies comme « hétérochromatine », à l'inverse des régions les moins compactées qui sont définies comme « euchromatine ».

L'euchromatine est un état pénétrable de la chromatine qui

contient des gènes actifs. A l'inverse, l'hétérochromatine était vue tout d'abord comme un moyen pour la cellule d'inactiver la transcription de certains gènes puisqu'on pensait que la compaction était telle qu'elle empêchait toutes les protéines régulatrices d'atteindre les gènes. Cependant, nous savons désormais qu'elle est requise pour l'expression de certains gènes, ce qui amène à penser qu'elle est plus un moyen pour la cellule d'organiser structurellement son génome qu'un moyen pour réprimer la transcription. Elle est notamment associée à l'expression de certains ARN non codants (ARNnc) (Grewal and Jia, 2007). Quand la chromatine est condensée de manière constitutive sur certaines régions, on parle « d'hétérochromatine constitutive ». C'est notamment le cas sur les télomères, les péricentromères, les éléments transposables et les séquences dérivées de virus (Morgan and Shilatifard, 2020).

Plus précisément, les génomes de levure et de mammifères sont organisés en domaines qui s'associent entre eux nommés « domaines d'interactions chromosomiques » (CID, *chromosomal interaction domains*) chez la levure, et « domaines d'associations topologiques » (TAD, *topologically associating domains*) chez les mammifères (Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012). Ces CID/TAD sont un moyen pour la cellule de compacter son génome et probablement de regrouper des gènes qui doivent être corégulés. Chez la levure, les CID comprennent un à cinq gènes dont la compaction est inversement corrélée avec le taux de transcription et les modifications d'histones activatrices (Hsieh et al., 2015). Les domaines sont séparés par des frontières qui sont qualifiées de fortes ou faibles selon le nombre d'interactions interdomaines qu'elles permettent entre deux domaines adjacents (figure 2). Les frontières sont enrichies en promoteurs de gènes et sont par conséquent enrichies en nucléosomes qui flanquent les régions dépourvues de nucléosomes (dont sont constitués les promoteurs), et elles sont enrichies en marques épigénétiques liées à la transcription. De plus, de nombreux régulateurs transcriptionnels sont liés à la chromatine au niveau de ces frontières, comme c'est le cas pour le Médiateur et certains remodeleurs de la chromatine comme RSC (André et al., 2021; Hsieh et al., 2015).

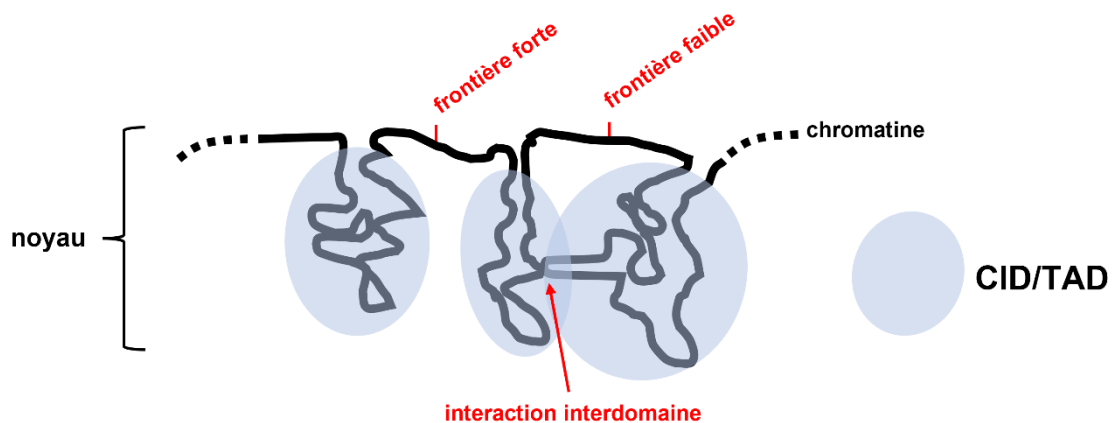


Figure 2. Représentation schématique des CID/TAD dans le noyau (figure originale).

Les CID/TAD permettent le regroupement de gènes qui peuvent être corégulés. En fonction des interactions interdomaines existantes entre deux CID/TAD différents, la frontière entre les deux est qualifiée de forte ou faible s'il n'y a aucune interaction ou quelques-unes entre eux respectivement. CID : domaine d'interactions chromosomiques, chromosomal interacting domain. TAD : domaine d'association topologique, topologically associating domains.

L'ADN peut donc se structurer pour séparer physiquement certaines régions qui sont destinées à être régulées spécifiquement. Les protéines et ARN peuvent aussi participer à une structuration fonctionnelle du noyau.

Les condensés moléculaires sont des organelles dépourvues de membrane physique. Ils compartimentent différents processus tels que l'initiation de la transcription sur les promoteurs, l'élongation de la transcription et la maturation des ARNm sur le corps des gènes, ainsi que la réparation de l'ADN au niveau des cassures double-brin (André et al., 2021). Ces condensés moléculaires qui se forment *in vivo* sont actuellement expliqués par le phénomène de séparation de phase liquide-liquide observé *in vitro*, et se réalise grâce à des régions désordonnées intrinsèques (IDR, *intrinsically disordered region*) que possèdent certaines protéines (Banani et al., 2017). En plus de compartimenter des processus génomiques, les condensés moléculaires peuvent participer à la séparation des différents états de la chromatine. En effet, les protéines qui maintiennent

l'hétérochromatine compactée peuvent former des condensés séparés par une phase liquide-liquide, ce qui repousse les protéines activatrices de la transcription (Morgan and Shilatifard, 2020; Schier and Taatjes, 2020).

Des condensés se forment autour des FT sur les promoteurs grâce à leurs IDR, qui attirent ainsi les protéines régulatrices de la transcription comme le Médiateur et la Pol II (Boija et al., 2018; Chong et al., 2018). Ces condensés sont alors appelés « condensés des promoteurs », et facilitent le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. A l'inverse, après l'initiation, quand la Pol II devient phosphorylée sur le corps des gènes, elle quitte les condensés des promoteurs pour entrer dans les condensés associés au corps des gènes. Ces derniers sont formés par les IDR des facteurs d'élongation et contiennent les facteurs de maturation des ARN et les ARN en cours de synthèse (Lu et al., 2018). La Pol II quitte le condensé associé au corps des gènes en fin d'élongation quand elle devient déphosphorylée, et elle peut être réutilisée pour un cycle de transcription en rejoignant de nouveau un condensé associé aux promoteurs. Les condensés associés aux promoteurs et corps des gènes sont donc distincts en composition et séparent physiquement deux étapes du processus transcriptionnel : l'initiation et l'élongation. Il est probable que les condensés puissent englober plusieurs gènes pour permettre des corégulations (Cramer, 2019).

Il apparaît désormais que la chromatine est organisée fonctionnellement via la formation de condensés moléculaires, mais aussi physiquement via la création de domaines nucléaires spécifiques. Si l'organisation physique peut se faire à l'échelle du noyau, c'est parce qu'elle se fait aussi à l'échelle locale, et le premier niveau d'organisation de la chromatine vient de l'enroulement de l'ADN autour d'un octamère d'histones : les nucléosomes.

5.1.2.1 Les nucléosomes

Le nucléosome est la plus petite unité de compaction de la chromatine. Il est formé d'un octamère de quatre protéines appelées « histones » : H2A, H2B, H3 et H4. Les histones sont organisées en hétérodimères qui sont présents en deux exemplaires dans la structure finale (deux dimères H2A-H2B et deux dimères H3-H4). 147

paires de bases (pb) d'ADN s'enroulent autour d'un octamère, laissant des morceaux d'ADN nus d'environ 10 à 50 pb entre chaque nucléosome selon l'organisme. Les résidus d'ADN chargés négativement interagissent avec les résidus d'histones chargés positivement. Sur les nucléosomes, le point de symétrie d'enroulement est nommé « la dyade », ce qui signifie qu'en amont et en aval de celle-ci, il y a la même longueur d'ADN enroulé. Les contacts ADN-nucléosome se font tous les 10,4 pb environ, ce qui en fait 14 au total. Ils sont désignés comme localisations superhélicoïdales (LSH) allant de LSH -7 à LSH +7 selon leur position relative par rapport à la dyade (LSH 0) (figure 3) (McGinty and Tan, 2015; Yan and Chen, 2020). Une histone supplémentaire appelé H1 est capable de lier les nucléosomes et de créer une structure supérieure de compaction : les chromatosomes (Clapier and Cairns, 2009).

Les nucléosomes ne sont pas uniformément positionnés sur l'ADN mais occupent des régions bien précises. En effet, leur fonction de compaction peut fermer l'ADN de sorte qu'il ne soit plus accessible à certaines protéines effectrices. Par exemple, tandis que les nucléosomes sont espacés de manière régulière sur le corps des gènes, ils sont peu présents au niveau des promoteurs de sorte que les séquences nécessaires à l'initiation de la transcription soient accessibles. Les promoteurs sont alors qualifiés de régions appauvries en nucléosomes (NDR, *nucleosome depleted region*). Par conséquent, les nucléosomes ne sont pas seulement une manière pour la cellule de compacter son ADN mais aussi un outil de régulation pour tous les processus génomiques. Ils peuvent être grossièrement considérés comme des répresseurs généraux puisqu'ils bloquent l'accessibilité à l'ADN : *in vitro*, quand ils sont placés sur certains éléments des promoteurs (boîte TATA et site d'initiation de la transcription), ils empêchent l'initiation de la transcription (Lorch et al., 1987). Cette fonction inhibitrice a aussi été observée *in vivo* (Han and Grunstein, 1988).

Les contacts entre l'ADN et les nucléosomes peuvent être faibles et même perdus. Certains nucléosomes sont dits « asymétriques » car les contacts sont perdus d'un côté de la dyade. Ils sont principalement localisés sur le promoteur des gènes et sont

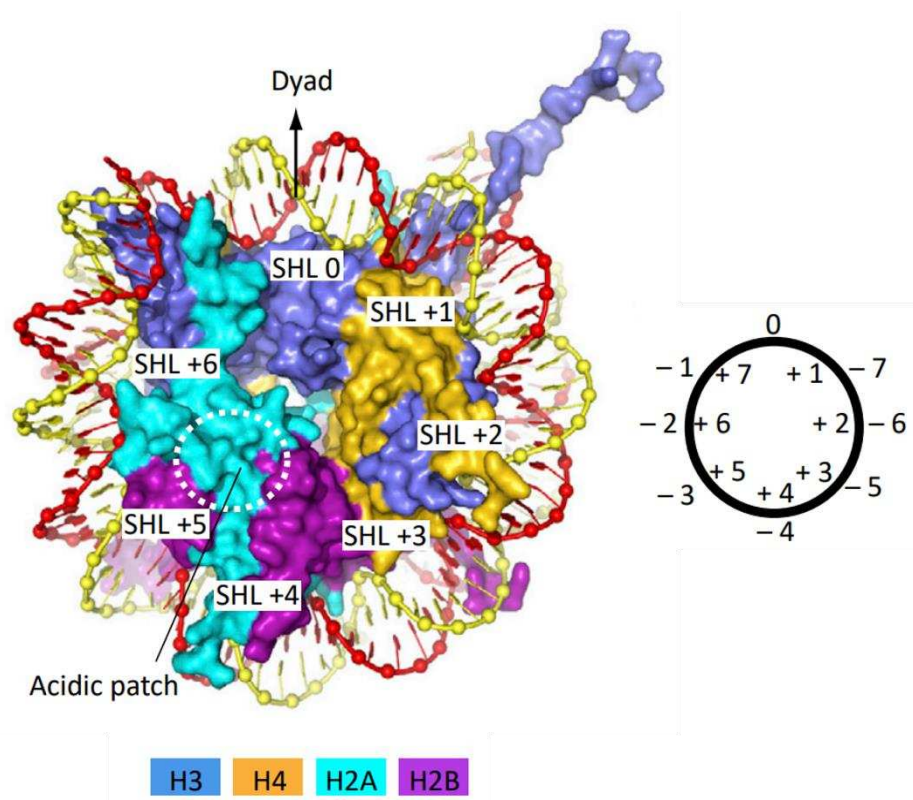


Figure 3. Structure d'un nucléosome vu d'en haut (Yan et Chen, 2020).

L'ADN (jaune et rouge) s'enroule autour d'un octamère d'histones (H2A-H2B, H3-H4) pour former le nucléosome. La dyade est la position qui correspond à la symétrie d'enroulement. Il y a 14 contacts ADN-histone qui sont nommés LSH (SHL: super-helicoidal localization) +1 à +7 pour les contacts en aval de la dyade, et -1 à -7 pour les contacts en amont de la dyade. Ici, la position des LSH +1 à +6 sont montrées. La queue de l'histone H3 est aperçue comme protubérant du nucléosome. Une représentation schématique de la position des LSH se trouve à droite de la figure.

plus fragiles que les nucléosomes qui établissent des contacts stables avec l'ADN (Ramachandran et al., 2015). Les nucléosomes dits fragiles sont définis comme tels car ils sont instables sur l'ADN. Ils pourraient correspondre à des nucléosomes en cours de remodelage et sont principalement trouvés sur le promoteur des gènes également (Kubik et al., 2015).

Les nucléosomes régulent les processus liés à l'ADN grâce aux

interactions histones-ADN. Bien qu'on puisse les considérer comme des répresseurs qui masquent des séquences cibles à des protéines effectrices, les mécanismes biologiques sont plus complexes. En effet, ils peuvent aussi se retrouver modifiés en termes de structure et composition, et servent alors de plateforme de régulation pour tous les processus liés à la chromatine.

5.1.2.1.1 Les variants d'histones

La première manière de réguler les nucléosomes consiste à changer leur composition en histones. En effet, chez les eucaryotes, des variants d'histones peuvent être intégrés dans les nucléosomes, c'est à dire des histones qui ont des fonctions spécifiques et qui diffèrent des histones dites canoniques H2A, H2B, H3 et H4 (Tableau 1). La différence entre les variants et les histones canoniques peut se trouver dans certains de leurs domaines comme la queue, ou même dans la séquence de quelques acides aminés (Li et al., 2007).

Tableau 1. Les variants d'histones impliqués dans la régulation de la transcription (adapté de Li et al., 2007).

Histone	Variant	Rôle dans la transcription	Localisation	Caractéristiques structurales	Fonctions
H3	H3.3	Activation	Région transcrite	Diffère de H3 par 4 acides aminés	La transcription déclenche son ajout et retrait de l'ADN
H2A	MacroH2A	Inactivation du chromosome X	Chromosome X	Partie C-terminale porte la plupart des fonctions ; le domaine de repliement empêche le mouvement sur l'ADN ; préfère former des nucléosomes hybrides	Inhibe l'initiation mais pas l'élongation ; interfère avec l'acétylation d'histones par p300 ; bloque le mouvement par ACF et le remodelage par SWI/SNF ; inhibe la liaison du FT NFκB
	H2A.Z	Activation et répression	Promoteurs, frontières de l'hétérochromatine	La boucle 1 diffère de H2A, gêne la formation d'un nucléosome hybride ; l'hélice C-terminale est essentielle pour la reconnaissance	Facilite la liaison de TBP ; est enlevé après l'activation ; empêche le remodelage au niveau des promoteurs et les

					modifications associées à l'élongation
	H2ABbd	Activation	Chromosome X et autosomes	Pas de partie C-terminale ; laisse 10 pb d'ADN nu de chaque côté de l'enroulement	SWI/SNF et ACF ne peuvent pas le mobiliser ; stimule la transcription activée
	H2A.X	Répression	Canonique chez la levure, distribué partout	Motif conservé sur la partie C-terminale phosphorylé après un dommage de l'ADN	

H2A.Z est particulièrement important dans la régulation de la transcription. En effet, ce variant d'histone est présent principalement dans les nucléosomes qui bordent les régions qui en sont appauvries (NDR) au niveau des promoteurs, mais il peut aussi être trouvé sur des NDR qui ne sont pas associées aux promoteurs (par exemple les NDR associées aux enhanceurs) (Barski et al., 2007). Ils peuvent être trouvés sur des promoteurs associés à des gènes actifs ou inactifs, ce qui montre qu'ils peuvent servir d'outils de reconnaissance des promoteurs pour la cellule, indépendamment de l'état transcriptionnel des gènes associés (Raisner et al., 2005). Ils sont moins stables que les histones canoniques et peuvent donc être retirés de l'ADN plus facilement (Zhang et al., 2005). Ces histones sont placés dans les nucléosomes après la formation de la NDR sur les promoteurs (Hartley and Madhani, 2009) et peuvent permettre ensuite le recrutement de facteurs spécifiques à travers des modifications post-traductionnelles. H2A.Z est aussi impliqué dans le maintien de l'euchromatine : il est retrouvé sur les frontières de l'hétérochromatine et empêche les modificateurs répresseurs de la chromatine Sir2 et Sir3 d'installer un environnement propre à celle-ci plus loin que ses frontières (Meneghini et al., 2003).

5.1.2.1.2 Les modifications d'histones

La deuxième façon de réguler les nucléosomes se fait par des modifications post-traductionnelles (PTM). Les histones peuvent porter plusieurs PTM sur des résidus spécifiques telles qu'une méthylation sur les arginines (R) ; une méthylation, acétylation,

ubiquitination, ADP-ribosylation ou sumoylation sur les lysines (K) ; et une phosphorylation sur les sérines (S) et thréonines (T). Ces modifications sont reconnues par certains domaines protéiques et portent des fonctions spécifiques, notamment dans la transcription (Tableau 2). Elles peuvent permettre par exemple le recrutement de régulateurs spécifiques sur des régions d'intérêt (Morgan and Shilatifard, 2020).

Tableau 2. Modifications d'histones associées à la transcription (adapté de Li et al., 2007).

Modification	Histone	Position	Enzyme de la levure	Enzyme des mammifères	Domaines de reconnaissance	Fonction dans la transcription
Méthylation	H3	K4	Set1	MLL, ALL-1, SET9/7, ALR-1/2, ALR, SET1	PHD, Chromo, WD-40	Activation
		K9	n/a	SUV39h, G9A, EU-HMTase I, ESET, SETBD1	Chromo (HP1)	Répression, activation
		K27		E(Z)	Ezh2, G9a	Répression
		K36	Set2	HYPB, SMYD2, NSD1	Chromo(Eaf3), JMJD	Recrutement de Rpd3S pour inhiber les initiations dans le corps des gènes
		K79	Dot1	DOT1L	Tudor	Activation
	H4	K20		PR-SET7, SET8	Tudor	Répression
Méthylation d'arginine	H3	R2		CARM1		Activation
		R17				
		R26				
	H4	R3		PRMT1	(p300)	
Phosphorylation	H3	S10	Snf1		(Gcn5)	Activation

Ubiquitination	H2B	K120/123	Rad6, Bre1	UBCH6, RNF20/40	(COMPASS)	Activation
	H2A	K119		PRC1L		Répression
Acétylation	H3	K56				(SWI/SNF)
	H4	K16	Sas2, NuA4	MOF	Bromodomaine	
	Htz1/H2AZ	K14	NuA4, SAGA			

Certaines modifications sont associées à l'activation de la transcription et à l'euchromatine, comme c'est le cas pour l'acétylation des histones H3 et H4 médiée par des histones acétyltransférases et la méthylation de H3K4 médiée par des méthyltransférases (Akhtar and Becker, 2000; Gates et al., 2017; Shilatifard, 2012). H3K4 méthylée est une marque des promoteurs actifs et des enhanceurs, mais elle est aussi liée à la recombinaison d'ADN, la réparation et la réplication. Quand cette lysine est triméthylée, elle permet en fait au nucléosome d'empêcher la liaison de certains répresseurs (DNMT et PRC2) sur la chromatine, afin qu'ils n'installent pas un environnement répressif pour la transcription (Douillet et al., 2020). Des marques d'acétylation sont aussi connues pour être associées à un environnement transcriptionnel actif : c'est le cas de H3K27 acétylée (H3K27ac) qui est une marque des enhanceurs actifs (Creyghton et al., 2010), et H4K16ac, H3K4ac et H3K79ac qui entravent la propagation de l'hétérochromatine en empêchant le recrutement de répresseurs (Ng et al., 2003; Suka et al., 2001).

A l'inverse, certaines modifications sont associées à l'hétérochromatine et à la répression génique, comme c'est le cas pour la méthylation de H3K9 et H3K27. H3K9 méthylée est impliquée dans la propagation de l'hétérochromatine : elle permet le recrutement de Swi6/HP1 sur les nucléosomes (Lachner et al., 2001). Swi6/HP1 s'oligomérisent et recrute la méthyltransférase Clr4/SUV39

qui étend la méthylation de H3K9 (Nakayama et al., 2001).

5.1.2.2 *Architecture des régions régulatrices des gènes*

Plusieurs régions sont importantes pour la régulation de l'expression des gènes. Ces régions régulatrices sont composées d'une séquence activatrice d'amont (UAS, *upstream activating sequence*) ou enhanceur, et d'un promoteur proximal. Les FT et les corégulateurs lient les UAS/enhanceurs tandis que les promoteurs proximaux sont liés par la machinerie de base transcriptionnelle.

5.1.2.2.1 Enhanceurs

Les enhanceurs (*enhancers*) sont des groupes de motifs d'ADN ciblés par des FT activateurs pour l'activation d'un gène associé. Chez la levure, ils sont appelés « séquences activatrices d'amont » (UAS, *upstream activating sequences*) et sont situés en moyenne relativement proches du promoteur proximal et du site de début de la transcription (TSS, *transcription start site*). A l'inverse, chez l'homme, les enhanceurs peuvent se situer très loin de leur gène associé, en amont ou en aval de ce dernier, éloigné jusqu'à un million de pb voir plus. Cependant, ils peuvent agir sur les gènes cibles probablement car ils sont localisés dans un même TAD (Long et al., 2016), même si la question du rôle des TAD dans la régulation de l'expression des gènes reste encore ouverte, en particulier quand il s'agit de savoir si les enhanceurs peuvent agir à travers des TAD différents (Ghavi-Helm et al., 2019). Les enhanceurs actifs sont caractérisés par la présence de FT et de corégulateurs recrutés par ces derniers, ainsi que de marques d'histones spécifiques comme H3K4me1 et H3K27ac (Morgan and Shilatifard, 2020). Si ces régions régulatrices permettent le recrutement de FT répresseurs plutôt qu'activateurs et que la transcription s'en voit inhibée, alors elles sont appelées silencers plutôt qu'enhancers. Bien que les enhanceurs soient des régions non codantes, ils peuvent être transcrits dans les deux directions et mener à la production d'ARN enhanceurs (Kim et al., 2010). Ces derniers ne codent pas pour des protéines mais sont impliqués dans le phénomène de boucle de gène (voir plus loin) (Hsieh et al., 2014).

Certaines régions peuvent contenir de nombreux enhanceurs regroupés et sont appelées super-enhancers. Elles sont fortement

enrichies en protéines régulatrices de la transcription telles que les FT et le Médiateur, ce qui permet la formation de condensés moléculaires. Ces super-enhanceurs sont associés aux gènes clés de l'identité cellulaire et aux oncogènes (Cramer, 2019; Pott and Lieb, 2015; Sabari et al., 2018).

Une fois que les FT ont recruté les corégulateurs sur les enhanceurs/UAS, ces derniers doivent agir sur le promoteur proximal pour la mise en place de la machinerie transcriptionnelle et l'initiation de la transcription.

5.1.2.2.2 Le promoteur proximal

Le promoteur proximal est éloigné des enhanceurs sur lesquels sont initialement présents les FT et les corégulateurs, si bien qu'un phénomène de boucle doit intervenir pour les mettre en relation physique. Ce promoteur proximal contient le site de démarrage de la transcription (TSS) (à partir duquel la transcription médiée par la Pol II démarre), et s'étend de -40 à +40 pb par rapport à ce dernier. Il contient aussi différents motifs qui permettent le recrutement de la machinerie de base contenant la Pol II. Parmi ces éléments se trouvent la boîte TATA, l'élément en aval du promoteur (DPE, *downstream promoter element*), l'élément de dix motifs (MTE, *motif ten element*), l'élément de reconnaissance de TFIIB (BRE, *TFIIB recognition motif*) et l'élément initiateur (Inr). Chez la levure, seulement la boîte TATA est présente (Schier and Taatjes, 2020). Elle est localisée 27 pb en amont du TSS et est le premier motif du promoteur à être lié par TFIID lors de l'initiation de la transcription. Les promoteurs contenant une boîte TATA représentent environ 20 % de tous les promoteurs chez la levure, tandis que les 80 % restants en sont dépourvus (Basehoar et al., 2004). Cependant, ces derniers promoteurs ont des séquences qui ressemblent fortement à la boîte TATA à deux pb près, et sont donc désignés comme *TATA-like*. Les TSS au niveau des promoteurs *TATA-like* sont plus proches de cet élément que sur les promoteurs des gènes qui contiennent le motif canonique (Rhee and Pugh, 2012). Chez l'homme, les promoteurs pourvus d'une boîte TATA sont associés à des gènes spécifiques d'un type cellulaire qui sont régulés durant la différenciation, tandis que chez la levure ils sont associés à des gènes de stress (Basehoar et al.,

2004; Müller and Tora, 2014). Alors que la boîte TATA peut être reconnue par TBP (*TATA-box binding protein*) d'une manière séquence spécifique, il est intéressant de noter que la torsion d'ADN que cette liaison génère peut aussi être perçue par d'autres régulateurs (Cramer, 2019).

Tout comme les éléments TATA, les autres éléments ont des propriétés de liaison spécifiques et permettent la liaison de protéines de la machinerie transcriptionnelle de base : tandis que l'Inr peut gérer l'initiation de la transcription sur des promoteurs *TATA-like* en permettant la liaison de TFIID, le BRE est lié par TFIIB (Deng and Roberts, 2005), le MTE et le DPE sont tous les deux liés par TFIID également (Purnell et al., 1994).

Les régions promotrices sont aussi caractérisées par la présence d'une région appauvrie en nucléosomes (NDR) bordée par deux nucléosomes contenant le variant H2A.Z, nommés -1 et +1 selon leur position relative par rapport au TSS (figure 4) (Raisner et al., 2005). En fait, le TSS est associé au nucléosome +1 chez la levure de

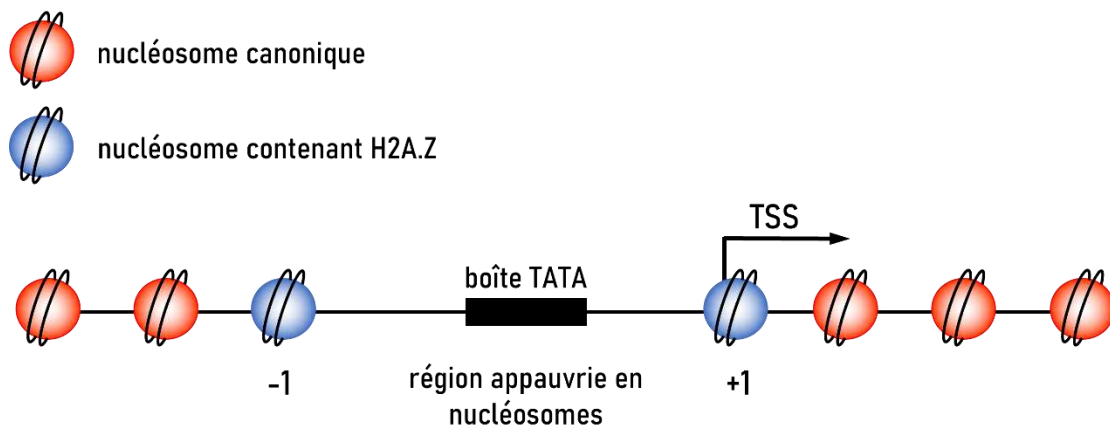


Figure 4. Représentation schématique d'un promoteur proximal (figure originale)

La région appauvrie en nucléosomes (NDR) est bordée par deux nucléosomes contenant le variant H2A.Z nommés -1 et +1. Le nucléosome +1 se trouve au niveau du TSS (transcription start site). L'élément TATA se situe dans la NDR de sorte qu'aucun nucléosome ne gêne son accessibilité.

sorte à ce qu'un remodelage de la chromatine doit avoir lieu pour l'exposer et permettre aux facteurs de l'initiation d'y avoir accès (Albert et al., 2007). De plus, beaucoup de promoteurs contiennent un nucléosome fragile qui a été nommé de la sorte puisqu'il est sensible à une faible digestion à la MNase (une enzyme bactérienne capable de dégrader l'ADN libre). Sa présence semble dépendre des tracts dA:dT et des motifs G/C (Kubik et al., 2015). Ces nucléosomes fragiles pourraient correspondre à des nucléosomes en cours de remodelage qui doivent être retirés de la chromatine pour permettre la future transcription.

Les NDR ne se forment pas passivement sur les promoteurs mais sont créées par des facteurs dédiés appelés remodeleurs de la chromatine et facteurs régulateurs généraux (Krietenstein et al., 2016). Les tracts dT:dA situés dans les NDR participent aussi à leur création (Raisner et al., 2005), tout comme les îlots CpG retrouvés sur certains promoteurs humains (Fenouil et al., 2012). Un mauvais positionnement des nucléosomes sur le promoteur peut mener à des événements transcriptionnels qui s'initient à partir du mauvais TSS (Whitehouse et al., 2007). En effet, les nucléosomes guident l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle qui se forme sur le promoteur. Il est à noter que cela entraîne un événement transcriptionnel bidirectionnel : tandis qu'un permet la création de l'ARNm, le second mène à la production d'un ARN non codant (Rhee and Pugh, 2012). Les nucléosomes qui bordent la NDR sont les mieux positionnés du génome, puis cette précision diminue avec la distance du TSS. Ils pourraient en fait agir comme un point de référence pour le positionnement de tous les nucléosomes du génome (Cramer, 2019).

Les nucléosomes sur le promoteur n'ont pas la même fonction sur tous les promoteurs. En effet, le nucléosome +1 peut aider à l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle sur les promoteurs plus dépendants de TFIID que de SAGA, qui sont aussi généralement dépourvus de boîte TATA. A l'inverse, ce même nucléosome semble entraver l'assemblage de la machinerie sur les promoteurs qui dépendent préférentiellement de SAGA et qui sont dotés d'une boîte TATA. Les nucléosomes participent donc de manière active à la régulation de la transcription (Basehoar et al., 2004; Rhee and Pugh,

2012).

5.2 TRANSCRIPTION

La transcription est un mécanisme finement régulé qui fait intervenir un très grand nombre de protéines régulatrices ainsi que des séquences d'ADN spécifiques. Elle se divise en trois grandes étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

5.2.1 Initiation

L'initiation de la transcription permet de préparer la Pol II à la transcription correcte du gène cible. En fait, la Pol II ne peut pas reconnaître le promoteur d'un gène par elle-même et initier la transcription au bon endroit. Elle doit être guidée par un ensemble de facteurs spécifiques que sont les corégulateurs et les facteurs de transcription généraux (GTF). L'étape d'initiation débute avec la liaison des FT sur les UAS/enhanceurs et se termine avec le départ de la Pol II du promoteur proximal. Une fois les FT liés aux enhanceurs, ils recrutent les différents corégulateurs afin de leur transmettre leurs signaux d'activation.

5.2.1.1 Corégulateurs

Les FT recrutent différents types de coactivateurs qui portent différentes fonctions. Certains sont responsables de la transduction du signal et permettent d'établir un lien fonctionnel avec le promoteur proximal comme le Médiateur, tandis que d'autres sont chargés de construire un environnement chromatinien favorable à l'initiation de la transcription. Cette dernière activité peut se faire à travers l'ajout de PTM sur les histones par des modificateurs de la chromatine, ou bien par la modification de leur organisation spatiale par des remodeleurs de la chromatine comme RSC.

5.2.1.1.1 Remodeleurs de la chromatine

Les remodeleurs de la chromatine (RC) sont des protéines ou

des complexes multiprotéiques capables de modifier la structure de la chromatine en altérant les contacts ADN-histones. Ils peuvent changer le positionnement du nucléosome sur l'ADN, l'expulser, ou encore modifier sa composition, le tout d'une manière qui dépend de l'hydrolyse de l'ATP. Dans les deux premiers cas, cela permet généralement la mise en évidence d'un motif de liaison nécessaire au processus dans lequel le RC intervient. En plus de la transcription, ces complexes sont impliqués dans un grand nombre de processus génomiques comme la réplication et la réparation de l'ADN (Clapier and Cairns, 2009).

Il y a 4 familles de RC : les familles SWI/SNF, ISWI, CHD et INO80. Chaque remodeleur appartient à une de ces familles en fonction de la structure de sa sous-unité catalytique (figure 5), les structures de ses sous-unités auxiliaires, et ses rôles biologiques. Cependant, tous les remodeleurs partagent des caractéristiques communes : tous interagissent avec l'ADN et les nucléosomes ; ils portent des domaines protéiques capables de reconnaître certaines modifications d'histones ; ils contiennent un domaine ATPase leur permettant de rompre les contacts ADN-histone ; ils portent des domaines régulant leur activité catalytique ; et ils portent des domaines qui leur permettent d'interagir avec les FT et d'autres régulateurs transcriptionnels (Tableau 3) (Clapier and Cairns, 2009).

La famille SWI/SNF est composée de deux remodeleurs chez la levure : SWI/SNF et RSC (voir plus loin, chapitre 4.4), dont les rôles sont de faire glisser les nucléosomes sur l'ADN et de les expulser dans différents processus génomiques dont la transcription. Leur sous-unité catalytique (Snf2 pour SWI/SNF et Sth1 pour RSC) est faite d'un domaine HSA, post-HSA et d'un bromodomaine en C-terminal. SWI/SNF et RSC ne partagent pas les mêmes fonctions dans la cellule. Chez la levure, ils ciblent différents promoteurs pour réguler la transcription.

Les homologues humains de SWI/SNF et RSC sont appelés BAF et PBAF respectivement (Lorch et al., 2001). Chez l'homme, BAF et PBAF ne sont pas les seuls membres de la famille SWI/SNF des mammifères, puisque leurs sous-unités peuvent s'assembler de différentes manières. Ainsi, beaucoup de complexes sont spécifiques à certains tissus : certains agissent dans le développement et la

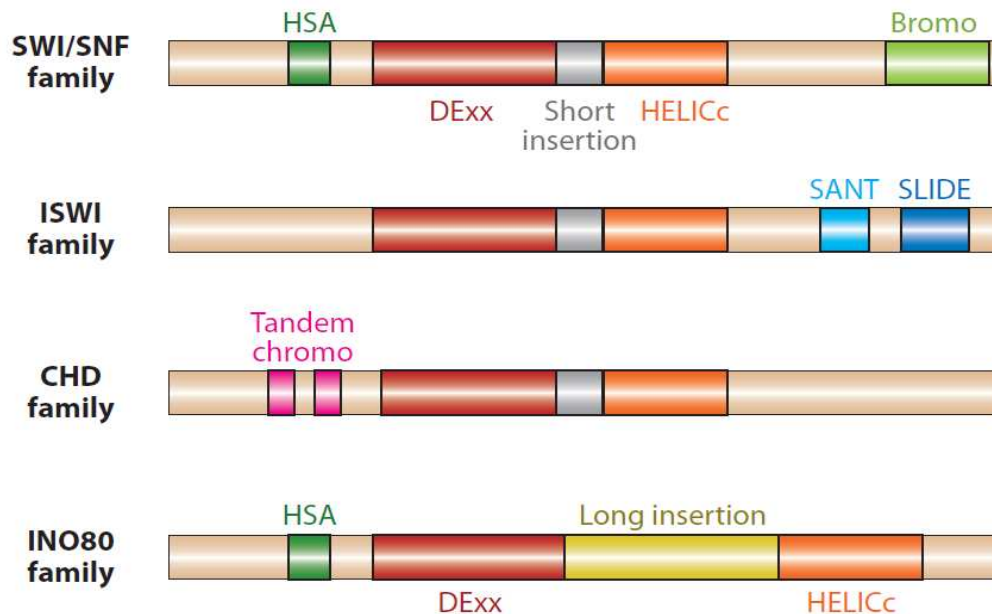


Figure 5. Structure des sous-unités catalytiques des remodeleurs de la chromatine (Clapier et Cairns, 2009).

Les quatre types de sous-unités catalytiques ont un domaine ATPase coupé par une courte ou longue insertion : DExx (rouge) et HELICc (orange). Ce sont les domaines qui bordent le domaine ATPase qui distinguent les différentes familles : les domaines HSA et bromodomaines pour la famille SWI/SNF, qui sont respectivement des domaines de liaison à l'ADN et aux lysines acétylées ; des domaines SANT/SLIDE pour la famille ISWI qui sont importants pour le déplacement des nucléosomes ; un chromodomaine en tandem pour la famille CHD, qui permet la reconnaissance des histones méthylés ; et un domaine HSA pour la famille INO80.

fonction neuronale (BAF du progéniteur neural, BAFpn, et BAF neuronal, BAFn) (Lessard et al., 2007), dans le développement cardiaque (BAF contenant la sous-unité BAF60c) (Sun et al., 2017), dans le développement du muscle (Lange et al., 2008), et la pluripotence des cellules souches embryonnaires (BAF spécifique des cellules souches embryonnaires, BAFse) (Zhang et al., 2021). Un BAF non canonique (BAFnc) a aussi été découvert. Comme BAFse, il est impliqué dans le développement mais cible différentes régions (Gatchalian et al., 2018). En effet, alors que BAFse se lie à des super-

enhanceurs ou enhanceurs qui portent une monométhylation sur H3K4, BAFnc se lie à des promoteurs qui sont triméthylés sur H3K4. De plus, BAFnc se lie aux frontières des TAD, suggérant qu'il peut jouer un rôle dans l'organisation spatiale de la chromatine. Il est aussi retrouvé dans d'autres lignées cellulaires comme des lignées hépatiques, de sarcome synovial, et de tumeur rhabdoïde (Michel et al., 2018). Chez les mammifères, les complexes BAF régulent la transcription également, mais pas seulement à travers le remodelage des nucléosomes. En effet, ils antagonisent les complexes répresseurs polycomb (PRC), qui sont impliqués dans la répression transcriptionnelle des gènes à travers des modifications d'histones. Les complexes BAF peuvent cibler les régions régulatrices qui contiennent les PRC et les expulser de la chromatine (Alfert et al., 2019).

La famille ISWI est composée de trois remodeleurs chez la levure appelés ISW1a, ISW1b et ISW2. Les homologues humains sont appelés NURF, CHRAC et ACF. La plupart des complexes de cette famille sont impliqués dans l'espacement des nucléosomes et l'inhibition de la transcription, tandis que d'autres espacent les nucléosomes aléatoirement et stimulent la Pol II. De plus, certains peuvent faire glisser les chromatosomes sur l'ADN et promeuvent l'assemblage de l'histone H1 dans la chromatine (Siriaco et al., 2009). La sous-unité catalytique de ces complexes porte un domaine SANT adjacent à un domaine SLIDE, qui forment ensemble un domaine de reconnaissance des nucléosomes qui lie l'ADN et les queues d'histones non modifiées. Les sous-unités auxiliaires ont de nombreux domaines comme l'homéodomaine de la plante (PHD, *plant homeodomain*), des bromodomaines, et des domaines de liaison à l'ADN (Clapier and Cairns, 2009). *In vitro*, ISW2 et ISW1a positionnent le nucléosome +1 en 5' des gènes, *de novo*, à partir d'ADN et d'histones. De plus, ISW1a espace les nucléosomes sur la région codante d'une manière physiologique après qu'ISW2 et INO80 les aient espacés aléatoirement (Krietenstein et al., 2016). En accord avec ces dernières observations, l'initiation de la transcription est perturbée dans des mutants *isw2*, soulignant le rôle de ce remodeleur dans le positionnement des nucléosomes pour la transcription (Whitehouse et al., 2007).

La famille CHD est composée d'un remodeleur chez la levure (CHD1) et de deux chez l'homme (CHD1 et NuRD). Leur sous-unité catalytique porte un chromodomaine arrangé en tandem. Les sous-unités auxiliaires ont des domaines de liaison à l'ADN, des PHD, des domaines BRK, CR1-3 et SANT. Leur rôle est de stimuler ou inhiber la transcription en faisant glisser les nucléosomes ou en les expulsant durant l'initiation mais aussi l'élongation (Simic et al., 2003; Walfridsson et al., 2007). Certains complexes jouent aussi un rôle dans l'assemblage des nucléosomes. Par exemple, NuRD contient l'histone désacétylase HDAC1/2 et des domaines protéiques de liaison aux îlots CpG méthylés (Murawska and Brehm, 2011; Pan et al., 2017).

La famille INO80 est composée de deux complexes chez la levure (INO80 et SWR1) et trois chez l'homme (INO80, SRCAP et SWR1). Leur sous-unité catalytique a le domaine ATPase coupé en deux par une longue insertion pouvant être liée par Rvb1/2 et une protéine liée à l'actine. Les rôles principaux de ces complexes prennent place dans l'activation de la transcription et la réparation d'ADN. Par exemple, INO80 est capable de positionner les nucléosomes -1 et +1 sur les promoteurs *in vitro* (Krietenstein et al., 2016). SWR1 peut aussi restructurer les nucléosomes en insérant le variant d'histone H2A.Z après l'expulsion de la version canonique (Mizuguchi et al., 2004).

Tableau 3. Composition des remodeleurs de la chromatine (adapté de Clapier and Cairns, 2009).

Famille et composition		Levure		Homme	
SWI/SNF	Complexe	Swi/Snf	RSC	BAF	PBAF
	ATPase	Swi2/Snf2	Sth1	BRM or BRG1	BRG1
	Sous-unités auxiliaires homologues	Swi1/Adr6	-	BAF250	-
		Swi3 Swp73 Snf5	Rsc8/Swh3 Rsc6 Sfh1	BAF155, BAF170, BAF60a/b/c BAF47 BAF57 BAF53a/b β-actin	
		Arp7, Arp9			
		Sous-unités	Swp82,	Rsc1/2, Rsc3-	-

	uniques	Taf14, Snf6, Snf11	5, 7, 9, 10, 30, Htl1, Ldb7, Rtt102			
ISWI	Complexe	ISW1a	ISW1b	ISW2	NURF	CHRAC ACF
	ATPase	Isw1		Isw2	SNF2L	SNF2H
	Sous-unités auxiliaires homologues	-	-	Itc1	BPTF	ACF1/WCRF180
	Sous-unités uniques	loc3	loc2, loc4		RbAp46 or 48	CHRAC17, CHRAC15 -
CHD	Complexe	CHD1			CHD1	NuRD
	ATPase	Chd1			CHD1	CHD3 CHD4
	Sous-unités auxiliaires homologues	-			-	-
	Sous-unités uniques	-			-	MBD3, MTA1/2/3, HDAC1/2, RBAP46/48, p66α,β, DOC-1
INO80	Complexe	INO80	SWR1	INO80	SRCAP	TRRAP/Tip60
	ATPase	Ino80	Swr1	hIno80	SRCAP	p400
	Sous-unités auxiliaires homologues	Rvb1,2		RUVBL1,2/TIP49A,B		
		Arp5,8	Arp6	BAF53A		
		Arp4, Actin 1		ARP5,8	ARP6	Actine
		Taf14 Ies2,6	Yaf9 Swc4/Eaf2 Swc2/Vps72 Bdf1 H2AZ H2B Swc6/Vps71	IES2,6	GAS41 DMAP1 YL-1	
	Sous-unités uniques	Ies1, Ies3- 5, Nhp10	Swc3,5,7	AMIDA, NFRKB, MCRS1, UCH37, FLJ90652, FLJ20309	-	TRRAP, TIP60, MRG15, MRGX, FLJ11730, MRGBP, EPC1, EPC-like, ING3

Les sous-unités présentées sur une même ligne sont homologues. BAF non canonique n'apparaît pas dans le tableau : il est constitué de sous-unités spécifiques nommées BRD9 et GLTSCR1, ainsi que des mêmes

sous-unités communes à PBAF et BAF exceptées BAF250 ou BAF200, BAF57, et BAF47.

5.2.1.1.2 Modificateurs de la chromatine

Les modificateurs de la chromatine (MC) sont des complexes multiprotéiques qui peuvent déposer des PTM sur les histones. Ces PTM peuvent être des acétylations, méthylations, sumoylations ou ubiquitinations. Les MC sont considérés comme « écrivains » ou « effaceurs » selon qu'ils déposent ou retirent ces marques. Par exemple, les acétylations sont déposées par des acétylases d'histones tandis qu'elles sont retirées par les désacétylases d'histones. Les MC régulent tous les processus génomiques y compris la transcription. Ils sont listés dans le tableau 2 avec leur modification associée. Par exemple, le variant d'histone H2A.Z est acétylé sur le promoteur proximal par NuA4 ou SAGA pour l'activation de la transcription (Li et al., 2007; Morgan and Shilatifard, 2020).

Chez l'homme, deux MC sont très importants pour la régulation des programmes transcriptionnels et partagent un lien de régulation très étroit avec les remodeleurs de la famille BAF : ce sont les complexes répresseurs polycomb (PRC, *polycomb repressive complex*) 1 et 2. PRC1 est composé des protéines CBX, PHC, PCGF, RING et SCMH dans sa forme canonique et inhibe la transcription en ubiquitinant H2AK119 (Cohen et al., 2020). PRC2 est fait d'EZH1 ou EZH2 (la sous-unité catalytique), EED, SUZ12, RBBP4/7 et AEBP2, et inhibe la transcription en triméthylant H3K27 (Cao and Zhang, 2004). PRC1 et PRC2 coopèrent pour répandre les marques de l'hétérochromatine : PRC2 est recruté sur un locus spécifique et triméthyle H3K27, ce qui permet à PRC1 d'être recruté et d'ubiquitiner H2AK119. Cette dernière marque permet le recrutement de PRC2 et la boucle recommence (Morgan and Shilatifard, 2020).

5.2.1.1.3 Facteurs régulateurs généraux

Les facteurs régulateurs généraux (GRF, *general regulatory factors*) sont des FT qui peuvent lier certains motifs, principalement au niveau des NDR des promoteurs dont ils participent à la formation

(Brahma and Henikoff, 2019). On les considère donc comme des corégulateurs et parmi eux se trouvent notamment les protéines Rap1, Reb1 et Abf1 (Buchman and Kornberg, 1990).

Quand la séquence cible de Reb1 est insérée artificiellement dans un gène inactif, une NDR se forme avec deux nucléosomes contenant H2A.Z qui la bordent. Cette séquence est le motif le plus conservé parmi les espèces, encore plus que la boîte TATA (Elemento and Tavazoie, 2005; Raisner et al., 2005). Ces facteurs peuvent être les premiers à agir sur certains gènes, et permettent ensuite le recrutement de RSC afin que ce dernier puisse positionner les nucléosomes -1 et +1. Cette dernière hypothèse est soutenue par le fait que RSC interagisse avec Reb1 (Hartley and Madhani, 2009). Abf1 et Reb1 permettent également un remodelage des nucléosomes sur les promoteurs, et cela mène à l'activation du gène associé (Yarragudi et al., 2004). Les GRF sont aussi impliqués dans l'inhibition de la propagation de l'hétérochromatine (Fourel et al., 2002).

5.2.1.1.4 Le Médiateur

Le Médiateur (voir plus loin, chapitre 4.3) est un complexe multiprotéique de haut poids moléculaire recruté par les FT sur les enhanceurs. Il transduit alors leurs signaux à la machinerie transcriptionnelle de base dont fait partie la Pol II sur le promoteur proximal.

5.2.1.2 Machinerie transcriptionnelle de base

La machinerie transcriptionnelle de base est un complexe universel composé de plusieurs protéines impliquées dans l'initiation de la transcription en permettant notamment la spécificité du promoteur. Elle s'est diversifiée durant l'évolution de sorte à complexifier la régulation génique, chose qui reflète la complexité d'un organisme plutôt que son nombre de gènes ou la taille de son génome (Duttke, 2015). Tandis qu'elle est faite de 6 et 15 sous-unités chez les bactéries et les archées, elle est composée de 45 sous-unités chez la levure et l'homme. Elle comprend la Pol II, les facteurs de transcription généraux (GTF) TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH. La protéine liant la boîte TATA (TBP, *TATA-box binding protein*) et les facteurs associés à TBP (TAF, *TBP-associated factors*) forment TFIID. La

machinerie transcriptionnelle de base est aussi appelée complexe de pré-initiation (PIC, *preinitiation complex*) lorsqu'elle est liée au promoteur proximal (Schier and Taatjes, 2020) et qu'elle peut initier la transcription avec des nucléotides *in vitro*. Les PIC sont homogènes en termes de composition (sauf concernant les TAF) qu'ils soient associés ou non à la transcription d'un ARNm ou d'un ARNnc. Dans une population de levure en croissance, on trouve 6 000 PIC dans chaque cellule, avec 70 % d'entre eux qui sont associés à la transcription de gènes codants pour des protéines (Rhee and Pugh, 2012). La Pol II est l'enzyme qui catalyse la synthèse de l'ARNm à partir de la matrice d'ADN. Elle est faite de douze sous-unités nommées de Rpb1 à Rpb12 (Tableau 4). Elle transcrit tous les gènes codant pour les protéines et beaucoup de gènes d'ARNnc également (Schier and Taatjes, 2020). Son architecture est faite de différentes parties qui portent différentes fonctions (figure 6) : une pince (*clamp*) qui contrôle l'ouverture et la fermeture d'une fente (*cleft*), qui est une cavité chargée positivement le long d'une face de la Pol II. Avant l'ouverture de son double brin dans la transcription, l'ADN est au-dessus de la fente. Après ouverture, l'ADN simple brin entre à l'intérieur de la fente et atteint le site actif, à côté duquel se situe le mur (*wall*), qui est un site où l'hybride ADN:ARN se défait. Le site au niveau duquel l'ADN quitte la fente est appelé la protrusion et pourrait participer aussi dans la réhybridation des deux brins d'ADN. Le site d'entrée des nucléotides triphosphates est appelé la cheminée (*funnel*), il part du site actif et va jusqu'à l'extérieur de la Pol II. Le canal de sortie de l'ARN commence près du mur et place l'ARN le long de la fente jusqu'à une sortie près de la sous-unité Rpb1. Deux parties ou plus résident dans Rpb1, notamment le gouvernail (*rudder*) et le couvercle (*lid*). Ils se situent près du site actif et aident à la séparation de l'hybride ADN:ARN au niveau du mur, ainsi qu'au guidage de l'ARN et de l'ADN au niveau du canal de sortie et de la protrusion. Rpb1 porte aussi une boucle de déclenchement (*trigger loop*), importante pour la fidélité de la transcription par la Pol II puisqu'elle permet la détection des *mismatches* qui pourraient se former. Elle porte aussi une hélice de pont (*bridge helix*) qui aide à la séparation des brins d'ADN au niveau du site actif (Schier and Taatjes, 2020).

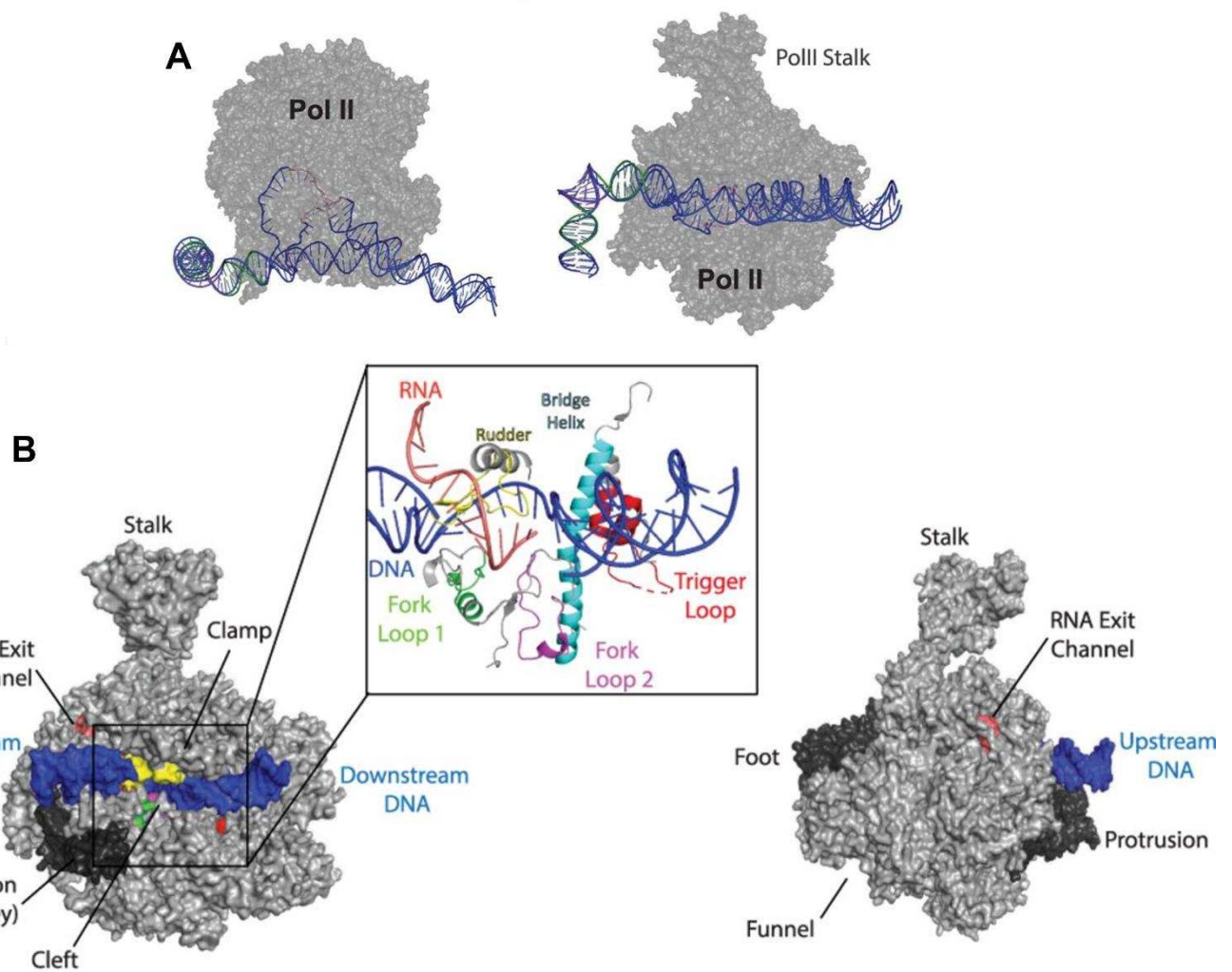


Figure 6. Visualisation de la structure de la Pol II (Schier et Taatjes, 2020).

(A) Structure de la Pol II en relation avec l'ADN. La structure de gauche nous montre la Pol II vue du dessus, avec l'ADN simple brin qui s'étend dans le site actif. La structure de droite nous montre la Pol II vue de face. (B) La Pol II montrée dans deux orientations différentes (rotation de 180°). L'ADN est en bleu, la tige (stalk), la pince (clamp), le pied (foot), la cheminée (funnel), et le canal de sortie de l'ARN (RNA exit channel) sont désignés. La protrusion et le pied sont montrés en gris foncé. Le zoom montre le site actif, avec la boucle de déclenchement (trigger loop) de RPB1 (acides aminés 1095-1130) en rouge, l'hélice de pont (bridge helix) de RPB1 (acides aminés 833-869) en cyan, son gouvernail (rudder) (acides aminés 318-338) en jaune, les fork loops 1 et 2 qui sont des domaines de RPB2 (acides aminés 461-480 et 499-520 respectivement) en vert et magenta, impliqués dans la stabilisation de l'ADN au niveau du site actif. La fork loop 2 stabilise notamment l'ADN qui ne sert pas de matrice pour la transcription.

Rpb1 est une sous-unité majeure de la Pol II qui contient un long domaine C-terminal (CTD, C-terminal domain) désordonné,

essentiel pour la transcription et la formation de condensés moléculaires (Boehning et al., 2018). La séquence du CTD consiste en une répétition de 52 heptades de YSPTSPS chez l'homme, et 26 chez la levure bourgeonnante. Il permet le recrutement de nombreux facteurs pendant la transcription comme celui du Médiateur durant l'initiation et celui des facteurs de maturation des ARN durant l'élongation (Kim et al., 1994; Komarnitsky et al., 2000).

Tableau 4. Sous-unités de la Pol II et leurs fonctions.

Sous-unité	Fonction
Rpb1	• Sélection du TSS, interaction avec TFIIIB (Berroteran et al., 1994) • Élongation, interaction avec TFIIIS (Archambault et al., 1992) • Porte le CTD, qui régule toutes les étapes de la transcription, le recrutement des facteurs d'élongation et de maturation des ARN néosynthétisés (Napolitano et al., 2014) • Porte le site actif (Schier and Taatjes, 2020)
Rpb2	• Sélection du TSS (Hekmatpanah and Young, 1991) • Élongation (Archambault et al., 1992)
Rpb3	• Interagit avec le Médiateur via Med20 et Med17 (Soutourina et al., 2011; Tsai et al., 2017) • Réponse aux FT (Tan et al., 2000)
Rpb4	• Stimulation de l'initiation (Edwards et al., 1991) • Maturation des ARN néosynthétisés (Runner et al., 2008) • Transport des ARNm (Sampath and Sadhale, 2005) • Réparation de l'ADN (Sampath and Sadhale, 2005)
Rpb5	• Séparation de l'ADN double brin (Martínez-Fernández and Navarro, 2018) • Interagit avec TFIIH (Richter et al., 2022) et TFIIIB (Miyao and Woychik, 1998)
Rpb6	• Élongation, interagit avec TFIIIS (Ishiguro et al., 2000)
Rpb7	• Stimulation de l'initiation (Edwards et al., 1991) • Maturation des ARN néosynthétisés (Runner et al., 2008) • Transport des ARNm (Sampath and Sadhale, 2005)

	• Réparation de l'ADN (Sampath and Sadhale, 2005)
Rpb8	• Ouverture de l'ADN (Kang et al., 2006)
Rpb9	• Sélection du TSS (Hull et al., 1995) • Fidélité de la transcription (Walmacq et al., 2009) • Interagit avec TFIIIF (Eichner et al., 2010) et TFIIIE (Van Mullem et al., 2002)
Rpb10	• Rôle architectural (Werner and Grohmann, 2011)
Rpb11	• Rôle architectural (Werner and Grohmann, 2011)
Rpb12	• Rôle architectural (Werner and Grohmann, 2011)

TFIID est fait de la TBP et de 14 ou 15 TAF. Il a une forme de fer à cheval contenant trois lobes nommés A, B et C. Le lobe A contient TAF5, TAF6/9, TAF4/12, TAF3/10, TAF11/13 et la TBP. Le lobe B contient TAF8/10 et partage TAF5, TAF6/9 et TAF4/12 avec le lobe A. Le lobe C contient TAF1, TAF2 et TAF47. Le lobe B est impliqué dans la liaison de l'ADN en amont du TSS tandis que le lobe C lie le TSS et les éléments situés en aval comme le DPE et le MTE. Les complexes de la levure et humain sont assez similaires, mais celui de la levure est plus compact (Patel et al., 2018).

TFIID lie les différents éléments du promoteur proximal afin d'initier la formation du PIC : la TBP lie la boîte TATA, TAF1 et TAF2 lient l'Inr, TAF6 et TAF9 lient le DPE. De plus, malgré le manque de l'Inr et du DPE chez la levure, Taf1 a été observé en aval du TSS (Rhee and Pugh, 2012). Les gènes dépourvus d'une boîte TATA, dont le taux de transcription varie peu et dont l'assemblage des nucléosomes sur le promoteur est en coopération avec l'assemblage du PIC, dépendent fortement de TFIID pour leur activation. Le complexe peut aussi reconnaître et lier H3K4 triméthylée (une marque épigénétique de l'activation génique) grâce à TAF3, et ainsi reconnaître le nucléosome +1 (Vermeulen et al., 2007). Les TAF peuvent aussi être des cibles spécifiques de certains FT et donc transmettre les signaux de ces derniers à la machinerie transcriptionnelle. Certains TAF sont spécifiques à un type cellulaire : TAF4B est retrouvé exclusivement dans les spermatides et les follicules ovariens pour la

spermatogenèse et la croissance folliculaire (Falender et al., 2005; Grive et al., 2014) ; TAF7L (un paralogue de TAF7) est impliqué dans le développement de la lignée germinale masculine chez la souris (Pointud et al., 2003) ; TAF8 est impliqué dans l'adipogenèse (Guermah et al., 2003) et TAF10 dans le développement du foie et l'érythropoïèse (Papadopoulos et al., 2015; Tatarakis et al., 2008).

TBP est une sous-unité de TFIID qui lie la boîte TATA en adoptant une forme de croissant, et tord ainsi l'ADN de 90° environ. Ce faisant, elle permet l'interaction entre des protéines de l'initiation qui étaient initialement trop distantes l'une de l'autre pour pouvoir interagir. Elle guide aussi la transcription en liant TFIIA et TFIIIB. Mot1 et NC2 sont deux régulateurs négatifs de la TBP qui l'empêchent de se lier à la boîte TATA ou aux séquences *TATA-like*, et stimulent de ce fait les gènes dépourvus de ces motifs (Hsu et al., 2008).

TBP a des homologues appelés les facteurs semblables à TBP (TRF, *TBP-related factors*). Ils peuvent être spécifiques d'un type cellulaire et requis pour des mécanismes particuliers. L'un d'entre eux, TRF2, est incapable de lier la boîte TATA et est principalement exprimé dans les testicules pour la différenciation des cellules de la lignée germinale (Sugiura et al., 2003). Il est aussi impliqué dans l'embryogenèse et requis pour la transcription de l'histone H1 en liant les promoteurs dépourvus d'une boîte TATA (Gibert and Karch, 2011; Kopytova et al., 2006). Un autre TRF, TRF3, est plus semblable à TBP puisqu'il peut lier la boîte TATA et interagir avec TFIIA et TFIIIB. De plus, il a des fonctions dans la folliculogenèse, la myogenèse et l'hématopoïèse (Goodrich and Tjian, 2010).

Un autre complexe qui contient certains TAF et qui interagit avec TBP est nommé SAGA. Ce complexe est composé de 20 sous-unités et est organisé en 4 modules : le cœur, le module Tra1, le module histone acétyltransférase (HAT) et le module déubiquitinase (DUB). Le module Tra1 est fait uniquement de la protéine Tra1 qui permet le recrutement de SAGA sur les promoteurs (Li et al., 2007). Le module HAT contient l'enzyme Gcn5 et le module DUB contient l'enzyme Ubp8. Le dimère Taf5-Taf6 est une plateforme structurale dans le complexe. SAGA est traditionnellement considéré comme un coactivateur, mais il partage des fonctions très similaires à celles de TFIID : il permet tout comme lui de délivrer TBP sur l'ADN et est

requis de manière générale pour la transcription médiée par la Pol II. A l'inverse de TFIIID, ce sont les gènes pourvus d'une boîte TATA qui sont très dépendants de lui pour leur activation (Baptista et al., 2017; Bhaumik and Green, 2002).

TFIIA est fait de deux ou trois protéines chez la levure ou l'homme, respectivement. Il est impliqué dans la stabilisation du PIC après une interaction avec TBP et interagit aussi avec SAGA (Warfield et al., 2004; Yokomori et al., 1994).

TFIIB n'est constitué que d'une protéine qui aide TBP à lier l'ADN. Il lie lui-même l'ADN en amont et en aval de la boîte TATA. Il stabilise le PIC grâce à une interaction avec la Pol II et participe à la sélection du TSS (Cho and Buratowski, 1999). Il stabilise également l'état ouvert de l'ADN (Chen and Hahn, 2003).

TFIIF est fait de deux protéines : Tfg1/RAP74 et Tfg2/RAP30. Il interagit avec la Pol II et l'empêche d'initier la transcription à partir d'un mauvais TSS. Il stimule aussi l'interaction de TFIIB et du Médiateur avec la Pol II, ce qui stabilise le PIC et aide au recrutement de TFIIIE. De plus, il stabilise l'ADN dans la fente de la Pol II et pourrait réguler l'état de phosphorylation du CTD, car RAP74 interagit avec de nombreuses phosphatases qui le ciblent (Lin et al., 2002). Il stimule aussi l'élongation (Schweikhard et al., 2014).

TFIIIE interagit avec TFIIH et stimule la fonction de ses sous-unités Ssl2/XPB et Kin28/CDK7 (Okamoto et al., 1998). Il stimule aussi l'ouverture de l'ADN par la Pol II au niveau du TSS avec laquelle il établit de nombreux contacts (Holstege et al., 1996).

TFIIH est fait de 10 sous-unités et est organisé en deux sous-complexes : le cœur (TFIIH) et le module kinase (TFIIK). Le cœur a une activité hélicase ATP-dépendante (Ssl2/XPB et Rad3/XPD) et le deuxième module a une activité kinase (Kin28/CDK7). Rad3/XPD ne joue pas de rôle directement dans la transcription mais il est requis pour la réparation d'ADN. Cependant, il garde un rôle structural et est important pour la stabilité du complexe (Peissert et al., 2020). A l'inverse, Ssl2/XPB joue un rôle direct dans la transcription puisqu'il est responsable de l'ouverture de l'ADN au niveau du TSS en

séparant les deux brins d'ADN, de sorte à ce qu'un brin unique atteigne le site actif de la Pol II dans la fente. Certaines études ont montrées que Ssl2/XPB pourrait être facultatif pour certains gènes et que TFIIIE pourrait le remplacer alors pour ouvrir l'ADN double brin (Holstege et al., 1996). Pendant l'initiation de la transcription, Kin28/CDK7 phosphoryle le CTD sur la sérine 5, ce qui permet le départ de la Pol II du promoteur (Helenius et al., 2011).

Les GTF sont résumés dans la Tableau 5 :

Tableau 5. GTF et leurs fonctions.

GTF	Sous-unités	Fonctions
TFIID	TBP Taf1 à Taf15	- Reconnait des motifs au niveau des promoteurs : boîte TATA, MTE, DPE - Induit une torsion de l'ADN - Interagit avec TFIIA et TFIIIB
TFIIA	Toa1/LN/ α Toa2/S/ γ LC/ β	- Interagit avec SAGA et TBP - Stabilise le PIC
TFIIIB	Sua7	- Stimule l'ouverture de l'ADN - Stimule le recrutement de TFIIIF-Pol II - Stabilise le PIC - Permet la sélection du TSS
TFIIIF	Tfg1/RAP74 Tfg2/RAP30	- Stimule le recrutement de TFIIIE - Stabilise le PIC - Permet la sélection du TSS - Interagit avec la Pol II et permet son recrutement dans le PIC
TFIIIE	α β	- Stimule l'activité kinase de TFIIH - Interagit avec la Pol II et stimule l'ouverture d'ADN sur le TSS
TFIIH	p62 p52 p44 p34 p8	- Ouvre l'ADN au niveau du TSS - Permet le passage de l'initiation à l'élongation - Impliqué dans la réparation

	Ssl2/XPB Rad3/XPD Kin28/CDK7 Cycline H MAT1	d'ADN
--	---	-------

5.2.1.3 Processus d'initiation

Une fois que les FT ont lié les enhanceurs et contacté les corégulateurs qui modifient l'architecture de la chromatine ou qui établissent des contacts avec les différents régulateurs, le PIC s'assemble sur le promoteur proximal. L'assemblage du PIC a été décrit séquentiellement *in vitro*, et c'est cette séquence que je décris par la suite. Cependant, il est à noter qu'il est bien plus complexe et dynamique *in vivo*, et qu'il n'y a pas une seule séquence d'assemblage possible (Baek et al., 2021; Esnault et al., 2008; Eyboulet et al., 2015; Nguyen et al., 2021; Sikorski and Buratowski, 2009; Zanton and Pugh, 2006; Zhang et al., 2016).

Premièrement, le lobe C de TFIID lie l'ADN en aval du TSS et TBP lie la boîte TATA, entraînant une torsion de l'ADN d'environ 90°. TAF11/13 arrête d'interagir avec TBP de sorte qu'elle puisse recruter TFIIA et TFIIB, qui vont alors stabiliser la structure engendrée par TBP en retour. TFIIA interagit avec TAF4/12 pour provoquer un réarrangement structural de TFIID pour qu'il puisse devenir transcriptionnellement compétent. TFIIB interagit avec la Pol II, liant ainsi l'ADN associé à TBP au complexe enzymatique.

Le prochain GTF à se joindre à l'ADN est TFIIIF : il lie l'ADN en amont du TSS en étant accompagné de la Pol II. Il provoque des changements de structure dans cette dernière afin qu'elle puisse lier l'ADN en amont et en aval du TSS. TFIIIF stabilise notamment le positionnement de l'ADN par rapport à la fente de la Pol II.

TFIIE et TFIIH sont ensuite recrutés à leur tour : TFIIH ouvre l'ADN double brin avec l'activité translocase 5' à 3' de Ssl2/XPB, et place ce locus au niveau du site actif de la Pol II. TFIIB, TFIIIF et TFIIE maintiennent cet état d'ouverture de l'ADN, après quoi la pince de la Pol II se ferme. TFIIB bloque le canal de sortie de l'ARN pour qu'un hybride stable ARN:ADN se forme dans le site actif de la Pol II. Une fois liés au promoteur, XPB et XPD cessent leur interaction, et TFIIH

adopte une forme de fer à cheval qui met CDK7 à proximité du CTD. Dans le même temps, le Médiateur, qui stimule le recrutement de chaque facteur depuis le début de l'assemblage et qui maintient la structure globale, stimule ce repositionnement de TFIH. Le Médiateur stimule aussi CDK7 qui phosphoryle le CTD sur la sérine 5, et stoppe son interaction avec ce dernier. Cette phosphorylation permet l'échappement du promoteur. L'élongation démarre et l'extrémité 5' de l'ARN subit une modification appelée le *capping* : une guanosine méthylée est ajoutée via un pont triphosphate au premier nucléotide de l'ARN, le protégeant ainsi des exonucléases. (Goodrich et al., 1996; Roeder, 1996; Thomas and Chiang, 2006).

Chez les métazoaires, rapidement après le début de l'élongation, une autre étape de régulation se met en place et porte le nom « d'arrêt proche du promoteur ». La Pol II s'arrête de manière stable et a besoin de facteurs d'élongation pour lire la suite de l'ADN (Dollinger and Gilmour, 2021).

In vitro, un mécanisme appelé « réinitiation » a été observé : certains composants du PIC peuvent rester sur le promoteur après l'échappement de la Pol II, ce qui permet le recrutement d'une nouvelle Pol II plus rapidement que *de novo* (Hawley and Roeder, 1987; Yudkovsky et al., 2000). *In vivo*, il a été montré qu'un inhibiteur de TFIID inhibait la première vague de transcription seulement, mais pas les suivantes, suggérant deux phénomènes d'initiation différents : *de novo* versus réinitiation (Zhang et al., 2015b). De plus, des vagues de Pol II impliquant des réinitiations ont été observées *in vivo* (Lenstra et al., 2016).

5.2.2 Élongation

5.2.2.1 Facteurs d'élongation

Tout comme pour l'initiation, certains facteurs sont dédiés à la régulation de l'étape d'élongation. Parmi eux se trouvent TFIIS, DSIF, NELF, P-TEFb, PAF et des chaperons d'histones.

TFIIS est fait de trois domaines. Le domaine II interagit avec la Pol II à travers Rpb1, tandis que le domaine III stimule le clivage des

molécules d'ARN associés à la Pol II lorsqu'elle a fait marche arrière durant la transcription. Cette marche arrière survient lors d'un arrêt de la Pol II et empêche le bon déroulement de la synthèse d'ARN. TFIIIS est donc considéré comme un facteur anti-pause. Par exemple, la Pol II peut s'arrêter devant des nucléosomes, et TFIIIS l'aide à reprendre l'élongation (Thomas et al., 1998).

DSIF et NELF sont deux facteurs stimulant la pause de la Pol II. DSIF est un dimère fait de SPT4 et SPT5 tandis que NELF est fait de quatre sous-unités : NELFA, NELFB, NELFC/D et NELFE. Contrairement à DSIF, NELF est absent chez la levure bourgeonnante, ce qui pourrait expliquer pourquoi il n'y a pas de pause proche du promoteur observée dans cet organisme. Ils interagissent tous les deux avec la Pol II d'une manière compétitive, ainsi qu'avec certains composants du PIC comme TFIIIB, TFIIIE et TFIIIF au niveau des promoteurs et dans le corps des gènes.

DSIF stimule aussi l'élongation et pourrait réguler les événements co-transcriptionnels comme la maturation de l'ARN synthétisé, puisqu'il lie la Pol II vers le canal de sortie des ARN (Core and Adelman, 2019; Schier and Taatjes, 2020).

P-TEFb est fait de la paire CDK9/CCNT1 (ou CCNT2) et peut être directement recruté par les FT. Il déclenche la formation d'un complexe d'élongation à travers les nombreuses interactions qu'il établit avec d'autres cofacteurs et les facteurs de maturation des ARN. Il phosphoryle le CTD sur la sérine 2 et les facteurs de pause DSIF et NELF afin de stimuler l'élongation (Fujinaga et al., 2004; Yamada et al., 2006). CDK9 peut aussi être retrouvé dans le super complexe d'élongation, qui est un grand ensemble de facteurs d'élongation. P-TEFb participe également à la formation des condensés moléculaires associés au corps des gènes grâce à l'IDR de CCNT1 (Lin et al., 2010; Lu et al., 2018; Peterlin and Price, 2006).

PAF est composé de cinq sous-unités chez la levure : Ctr9, Leo1, Paf1, Cdc73 et Wdr61. Chez l'homme, la sous-unité SKI8 est aussi présente. Ce complexe lie la Pol II une fois que NELF s'est dissocié d'elle, et stimule la transcription en recrutant des modificateurs de la chromatine, des remodeleurs de la chromatine, et des chaperons d'histones comme COMPASS, Chd1, Spt6 et FACT

(Hou et al., 2019; Pavri et al., 2006; Vos et al., 2018).

Spt6 et FACT sont des chaperons d'histones, c'est à dire qu'ils sont capables de lier les nucléosomes et de réguler leur assemblage sur la chromatine. Spt6 interagit avec la Pol II et est impliqué dans la maturation des ARN ainsi que dans la dynamique des nucléosomes durant l'élongation (Vos et al., 2018). FACT interagit avec les dimères H2A/H2B et les assemble sur l'ADN. Ces chaperons d'histones permettent le réassemblage des nucléosomes après le passage de la Pol II, empêchant ainsi l'initiation depuis l'intérieur d'un gène (Kaplan et al., 2003; Mason and Struhl, 2003).

Nap1 est aussi un chaperon d'histones : il prend en charge l'octamère d'histones quand il a été expulsé par RSC durant l'élongation, et permet son réassemblage dans la chromatine (Lorch and Kornberg, 2017).

5.2.2.2 *Processus d'élongation*

Après l'échappement du promoteur, TFIIIF et TFIIIE doivent se dissocier pour laisser les facteurs d'élongation DSIF et NELF lier la Pol II pour l'étape de pause. Cette pause qui s'effectue à proximité du promoteur a lieu chez les métazoaires mais pas chez la levure, bien que des pauses qui surviennent plus loin dans le gène sont observées aussi dans cet organisme (Churchman and Weissman, 2011). Cela peut arriver par exemple lorsque la Pol II rencontre un dommage à l'ADN, un nucléosome, un FT, ou qu'elle incorpore le mauvais NTP, et cela a pour effet de l'empêcher d'avancer (Bondarenko et al., 2006; James et al., 2017; Singh et al., 2020).

La pause proche du promoteur se caractérise par un arrêt très stable de la Pol II environ 20 à 60 pb en aval du TSS. Cette étape permet une modification en 5' de l'ARN néosynthétisé (le *capping*), empêche une réinitiation trop rapide, et permet le maintien de la NDR au niveau du promoteur (Gilchrist et al., 2010). Les pauses qui surviennent dans le corps du gène sont beaucoup moins stables et la Pol II est expulsée de l'ADN plus rapidement. Ces arrêts font faire une marche arrière à la Pol II de quelques pb (*backtracking*), ce qui fait que l'extrémité 3' du transcrit d'ARN ne se trouve plus alignée avec le site actif, et la Pol II doit donc retourner au site de pause initial ou cliver le transcrit. Dans cet état, elle peut aussi être polyubiquitinilée

puis dégradée.

DSIF et NELF stimulent cette étape de pause. En effet, NELFA/C lie RPB1 de sorte à bloquer l'entrée des nucléotides triphosphates (NTP) dans le site actif. De plus, cette liaison stabilise l'hybride ARN:ADN dans le site actif et empêche TFIIIS d'interagir avec la Pol II. Pour résoudre cette situation, P-TEFb phosphoryle NELF avec sa sous-unité CDK9, ce qui entraîne sa dissociation du complexe enzymatique. TFIIIS peut alors s'associer avec la Pol II et stimuler le clivage de l'ARN. Cela crée un nouveau site libre pour qu'un NTP s'hybride avec l'ADN. PAF lie aussi la Pol II après l'exclusion de NELF et stimule l'élongation. Dans le même temps, CDK9 phosphoryle DSIF qui stabilise alors le complexe d'élongation et stimule la processivité de la Pol II. Il phosphoryle aussi le CTD sur la sérine 2, permettant alors le recrutement de Spt6, de facteurs de maturation de l'ARN, de facteurs d'élongation et de modificateurs de la chromatine comme Set1 et Set2. Ensemble, PAF, DSIF et Spt6 stimulent l'élongation.

A mesure que la Pol II avance sur le gène, son CTD devient de plus en plus phosphorylé, permettant la création d'un condensé moléculaire propre à l'élongation qui attire les facteurs d'élongation et d'épissage, et qui repoussent les facteurs d'initiation comme le Médiateur (Schier and Taatjes, 2020). De plus, durant l'élongation, de nombreux régulateurs comme les modificateurs de la chromatine agissent sur les nucléosomes. En effet, les nucléosomes proches de la Pol II se voient acétylés par SAGA et NuA4 tandis que les nucléosomes en amont sont désacétylés par Set1 et Set2. Cela permet à RSC d'être recruté sur les particules situées en aval de la Pol II et de les remodeler de sorte que la Pol II puisse transcrire l'ADN.

Alors qu'elle approche de la fin du gène et donc des sites de terminaison, la thréonine 4 du CTD devient phosphorylée par CDK9 et cette marque permet la maturation des ARN en 3' (Eaton and West, 2020; Sheridan et al., 2019).

5.2.3 Terminaison

Différents processus de terminaison de la transcription existent dans différents contextes et pour différents types de gènes. A la fin de la plupart des gènes se trouve une séquence avec un signal poly(A)

(SPA) qui correspond au motif AAUAAA entouré de séquences riches en U et U/GU en amont et en aval, respectivement. Le SPA est reconnu par CPSF, CSF et les complexes CFI/II_m, qui entraînent le clivage et la polyadénylation de l'ARN. Précisément, CPSF30 et WDR33 (complexe CPSF) lient le motif AAUAAA et le clivage *per se* est réalisé par l'endonucléase CPSF73 (Eaton and West, 2020; Mandel et al., 2006).

Différents modèles sont proposés pour expliquer comment la terminaison survient. Selon le modèle allostérique/antitermineur, la transcription du SPA engendre soit un changement de conformation de la Pol II, soit une dissociation des facteurs qui la lie, ce qui entraîne la terminaison : des facteurs d'antiterminaison comme SCAF4 et SCAF8 empêchent la terminaison pendant l'élongation avant la transcription du SPA. C'est le changement de conformation de la Pol II induit par la transcription du SPA qui déclenche la terminaison sans clivage du transcrit (Gregersen et al., 2019; Zhang et al., 2015a).

Dans le modèle de la torpille, une exonucléase 5'-3' clive l'ARNm et le dégrade jusqu'à atteindre la Pol II, ce qui cause la terminaison. XRN2 chez l'homme et Rat1 chez la levure sont deux enzymes qui peuvent porter cette fonction (Kim et al., 2004; West et al., 2004).

En réalité, ce qui se passe dans la cellule pourrait correspondre à une combinaison des deux modèles précédents : une fois que le SPA est transcrit, un switch allostérique entraîne la décélération de la Pol II de sorte que XRN2 la rattrape. Chez la levure à fission, PP1/Dis2 déclenche ce phénomène par phosphorylation du facteur d'élongation Spt5. Chez la levure bourgeonnante, PP1 déphosphoryle en plus la tyrosine 1 du CTD, ce qui permet le recrutement de facteurs de terminaison (Cortazar et al., 2019; Eaton et al., 2020; Parua et al., 2018).

XRN2 peut prendre en charge aussi bien les transcrits maturés que ceux qui ne le sont pas, ce qui pourrait permettre un renouvellement rapide des enzymes de maturation tôt dans le processus transcriptionnel (Brannan et al., 2012). En même temps, la Pol II phosphorylée sur la sérine 2 est une cible majeure de XRN2 et CPSF, ce qui montre que cette phosphorylation, qui est associée à une élongation efficace, peut aussi être un signal positif pour la

machinerie de terminaison (Davidson et al., 2012; Nojima et al., 2015).

D'autres mécanismes de terminaison existent au-delà de la transcription du SPA. Par exemple, XRN2 est impliqué dans un type de terminaison induite par un oligonucléotide antisens (Lee and Mendell, 2020). De plus, Nrd1, une protéine liant les ARN, peut causer la terminaison chez *S. cerevisiae* plutôt que Rat1 (Rondón et al., 2009). Les gènes d'histones sont aussi dépourvus de SPA : à la place, le petit ARN nucléaire U7 recrute CPSF73 à la fin des gènes et ce dernier clive l'ARN (Sun et al., 2020).

Dans les cellules, seulement une fraction d'ARN polymérases atteint la fin des gènes. En effet, la terminaison peut arriver prématurément. Par exemple, les sites de terminaison qui sont à l'intérieur des gènes peuvent arrêter la Pol II et lui faire faire une marche arrière. De même, les polymérases en pause proches du promoteur peuvent être terminées, et le processus dépend de INTS11 (Elrod et al., 2019).

5.3 LE MEDIATEUR DE LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE

Le Médiateur est un très grand complexe multiprotéique recruté par les FT sur les enhanceurs, essentiel pour la transcription des gènes transcrits par la Pol II (Soutourina, 2018).

5.3.1 Découverte

En 1990, le phénomène d'interférence des activateurs était découvert : un FT en plus grande quantité qu'un autre pouvait inhiber la transcription médiée par ce dernier. De plus, cette inhibition pouvait être levée *in vitro* en ajoutant une fraction nucléaire purifiée de *S. cerevisiae* à l'expérience. Cela pouvait signifier qu'il y avait un médiateur agissant entre les FT et la machinerie transcriptionnelle. Cependant, ni TFIID ni la Pol II, qui étaient déjà connus comme pouvant interagir avec des FT, ne furent identifiés comme ce médiateur (Kelleher et al., 1990). Un nouveau complexe fut alors

purifié et caractérisé comme le Médiateur, puisqu'il permettait l'activation de la transcription médiée par les FT (Flanagan et al., 1991).

En parallèle, des criblages génétiques pour les supprimeurs de la troncature du CTD de la plus grande sous-unité de la Pol II ont permis d'identifier les gènes *SRB* (*suppressor of RNA polymerase B*). Ces gènes correspondaient à plusieurs sous-unités du Médiateur. Ces protéines Srb étaient également caractérisées comme se liant au CTD de la Pol II et stimulant la transcription *in vitro* comme composants du PIC (Hengartner et al., 1995; Nonet and Young, 1989; Thompson et al., 1993).

Les différentes protéines qui avaient été trouvées comme impliquées dans la médiation du signal entre FT et machinerie transcriptionnelle et dans la suppression de la troncature du CTD furent purifiées ensemble dans un seul et même complexe qui fut nommé le Médiateur (Kim et al., 1994).

Le Médiateur humain fut découvert d'une manière similaire (Boyer et al., 1999; Näär et al., 1999; Rachez et al., 1999; Ryu et al., 1999).

5.3.2 Structure et organisation

5.3.2.1 Chez *Saccharomyces cerevisiae*

Le Médiateur est composé de 25 sous-unités chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et atteint une masse moléculaire qui dépasse 1 million de daltons (Tableau 6). Des sous-structures ont parfois été obtenues séparément, comme la structure d'un module seul, ou à l'inverse, la structure du Médiateur a pu être obtenue aussi en interaction avec des composants du PIC. Les données sur la structure du Médiateur ont été obtenues par différentes méthodes : des analyses biochimiques couplées à une réticulation et une spectrométrie de masse, par cristallographie à rayons X à des résolutions d'environ 4.5 angströms, par microscopie cryo-électronique à des résolutions d'environ 4.3, 9.7, 15, 18, 20 et 28

angströms (Cai et al., 2009; Imasaki et al., 2011; Plaschka et al., 2015; Robinson et al., 2015, 2016, 2012; Sato et al., 2016; Tsai et al., 2013, 2014; Wang et al., 2014). Ces études structurales ont révélé que le complexe s'organise en 4 modules nommés la tête, le milieu, la queue, et le module kinase (figure 7), ce dernier s'associant de manière transitoire aux trois autres. Il est à noter que la structure du Médiateur est dynamique et dépend du contexte, notamment de l'étape transcriptionnelle et de ses interactants. La tête et le milieu sont assez rigides, mais la queue est très flexible, ce qui rend difficile l'obtention de sa structure à haute résolution.

Le module de tête contient Med6, Med8, Med11, Med17, Med18, Med20 et Med22. Le domaine N-terminal de Med17 (acides aminés 1 à 122) interagit avec Med4, Med7 et Med21 qui sont dans le module du milieu, connectant ainsi ces deux parties. La plupart de ses autres résidus (123-687) créent des interactions avec les autres sous-unités de la tête. Il interagit aussi de manière importante avec Med14.

Un paquet de quatre hélices créées par Med6, Med8 et Med17 forme le bras (*arm*) du Médiateur et est important pour la liaison au CTD de la Pol II. Il se situe près de la colonne (*spine*), qui est une structure de sept hélices alphas créées à partir de Med6, Med8, Med11, Med17 ainsi que Med22 et qui est impliquée dans la liaison au CTD également. De plus, Med8 et Med17 interagissent avec Rpb4 et Med20 avec Rpb3 et Rpb1. Med18 interagit aussi avec Rpb1.

Le module du milieu contient Med1, Med4, Med7, Med9, Med10, Med19, Med21 et Med31. Med7, Med21, Med4 et Med9 forment un tétramère qui est l'ossature du module, autour de laquelle s'associent les autres sous-unités. Ce module peut être coupé en deux parties : une première faite de Med7-Med21 liés à Med10, Med19 et Med31 ; une seconde faite de Med4-Med9 liée à Med1. Les seules protéines qui interagissent avec ces deux parties du module du milieu sont Med17 et Med14.

Le module contient des domaines spéciaux comme le crochet (*hook*) et la poignée (*knob*). Le crochet est fait de motifs appartenant à Med4, Med7, Med10, Med14, Med19 et Med21. Il crée une sorte d'étui pour TFIIH et est impliqué dans la liaison au CTD et à Cdk8. La poignée est composée de régions de Med4, Med7, Med14 et Med31

et connecte le milieu à la tête à travers les interactions entre Med31-Med8 et Med4-Med6. Elle interagit aussi avec le CTD. Elle interagit également avec un domaine additionnel formé de deux longues hélices alphas de Med7 et Med21 nommé "la charnière" (*hinge*). Ce dernier domaine connecte le crochet à Med4-Med9 et stimule une interaction stable entre le Médiateur et la Pol II.

Tableau 6. Sous-unités du Médiateur.

Module	Sous-unités chez <i>S. cerevisiae</i>	Sous-unités chez l'homme
Tête	Med6 Med8 Med11 Med17 Med18 Med20 Med22	MED6 MED8 MED11 MED17 MED18 MED20 MED22
Milieu	Med1 Med4 Med7 Med9 Med10 Med19 Med21 Med31	MED1 MED4 MED7 MED9 MED10 MED19 MED21 MED31 MED26
Queue	Med2 Med3 Med5 Med14 Med15 Med16	MED29 MED27 MED24 MED14 MED15, MED23 MED16 MED25 MED28 MED30

Kinase	Med12 Med13 Cdk8 CycC	MED12/12L MED13/13L CDK8/CDK19 Cycline C
--------	--------------------------------	---

*Bien que Med14 soit classé dans le module de queue dans ce tableau, il est en réalité une sous-unité charnière du complexe entier et se retrouve dans les trois modules principaux. Les sous-unités essentielles chez la levure *S. cerevisiae* sont en gras. Les sous-unités homologues sont sur une même ligne.*

Le module de queue contient Med2, Med3, Med5, Med15 et Med16. Les domaines N-terminaux de Med2 et Med3 ainsi que les domaines C-terminaux de Med15 et Med16 sont proches du module du milieu. Med2-Med3 peut être isolé en tant qu'hétérodimère ou trimère en combinaison avec Med15, qui est une cible importante de nombreux FT. La région C-terminale de Med15 interagit avec Med16, stabilisant son association au module ainsi que celle de Med5. Med16 participe à la structuration du module. Les interactions entre les FT et le Médiateur semblent fortes et s'établissent principalement via le module de queue, au niveau de poches hydrophobes.

Tandis qu'elle était pensée à l'origine comme une sous-unité du module de queue, Med14 est une sous-unité particulière qui interagit avec le complexe entier. C'est la seule sous-unité de Médiateur à interagir avec les trois modules principaux. Elle interagit avec Med2 et Med15 dans la queue grâce à sa partie C-terminale (résidus 712-1082) et avec Med4, Med9, Med10, Med21 dans le module du milieu grâce à sa région N-terminale (résidus 1-711). Med14 interagit aussi avec Med6, Med17 et Med20 dans la tête, rassemblant ainsi les modules du milieu et de la tête. Cette sous-unité sert de plateforme d'assemblage pour le Médiateur et structure le complexe dans son entier. Elle contacte aussi la Pol II via Rpb11.

Le module kinase est fait de Cdk8, CycC, Med12 et Med13. Son interaction avec le reste du Médiateur via le crochet est exclusive avec l'interaction entre le Médiateur et la Pol II à cause des changements conformationnels que ces interactions génèrent. Cela peut être dû au crochet du module du milieu : quand le crochet interagit avec le module kinase, ce dernier obstrue une surface

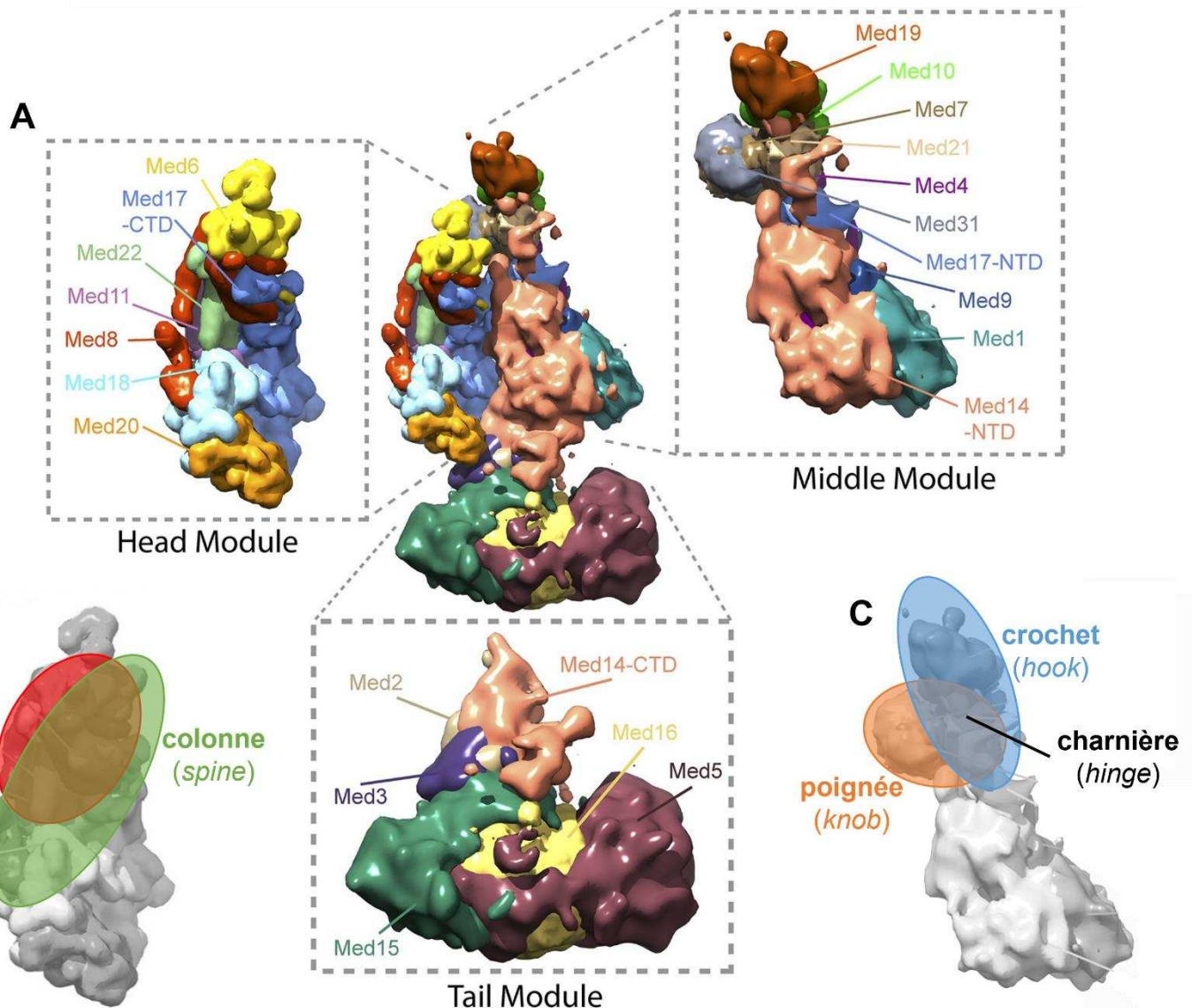


Figure 7. Architecture du Médiateur : carte de densité des trois modules principaux (adapté de Robinson et al., 2015).

(A) Carte de densité des trois modules principaux. (B) Position du bras (arm) et de la colonne (spine) dans le module de tête. (C) Position du crochet (hook), de la poignée (knob), et de la charnière (hinge) dans le module du milieu.

d'interaction avec la Pol II. Chez la levure et l'homme, Med13 lie

physiquement le module kinase au Médiateur via les sous-unités du crochet Med9 et Med14. Med12 connecte le dimère CycC/Cdk8 à Med13 et est requis pour l'activité enzymatique de Cdk8.

5.3.2.2 *Chez les mammifères*

Bien qu'il y en ait moins que chez la levure, on dispose également de données structurales concernant le Médiateur des mammifères. Sa structure a été étudiée par réticulation et spectrométrie de masse, et observée par microscopie cryo-électronique à une résolution d'environ 4.5 et 30 angströms (Cevher et al., 2014; Knuesel et al., 2009; Rengachari et al., 2021; Sato et al., 2016; Tsai et al., 2014; Zhao et al., 2021).

Le Médiateur humain est fait de 30 sous-unités et atteint une masse moléculaire d'environ 1,4 millions de daltons (Tableau 6). Bien que les homologies de séquences entre les sous-unités du Médiateur de la levure et de l'homme peuvent être relativement faibles, la structure et l'organisation du complexe sont très bien conservées entre les deux organismes (Bourbon, 2008). Comme chez la levure, le Médiateur humain est organisé en quatre modules : la tête, le milieu, la queue et le module kinase, avec MED14 agissant comme un échafaudage pour le complexe entier. Les connexions inter-modules sont conservées également. Cependant, les conformations sont légèrement différentes entre les complexes des deux organismes et le Médiateur des mammifères est doté de sous-unités spécifiques absentes chez la levure : MED23, MED25, MED26, MED27, MED28, MED29 et MED30, qui lui permettent une plus grande stabilité de conformation.

Le module de tête est fait de 7 sous-unités : MED6, MED8, MED11, MED17, MED18, MED20 et MED22, avec MED17 jouant un rôle charnière. Le module adopte une conformation légèrement différente de celle observée chez la levure résultant en un changement des positions relatives du haut et du bas du module. La tête interagit avec MED14 et le module de queue.

Le module du milieu est fait de 9 sous-unités : MED1, MED4, MED7, MED9, MED10, MED19, MED21, MED26 et MED31. C'est un

module rigide qui peut servir comme un transmetteur de changements structuraux de la queue vers la tête. Sa partie centrale est divisée en deux sections faites de MED7-MED21 et MED4-MED9, qui présentent une courbure différente de chez la levure. Encore ici, bien que la structure soit bien conservée entre les deux organismes, la conformation diffère. Le module du milieu interagit avec la queue seulement via MED1 et MED24, et une délétion de MED1 n'a pas d'effet sur la conformation de la queue mais permet aux deux autres modules d'adopter une conformation différente permettant une liaison plus forte au CTD.

MED14 est structurellement très similaire à son homologue de levure, mais sa partie C-terminale est plus large et est impliquée dans les interactions avec la queue.

Le module de queue est fait de 9 sous-unités : MED15, MED16, MED23, MED24, MED25, MED27, MED28, MED29 et MED30. Il est divisé en deux portions : une basse et une haute, la dernière servant de pont entre le module de queue et le reste du complexe. La portion haute est faite de 4 sous-unités organisées en dimères : MED28-MED30 et MED27-MED29. Cette dernière paire est en contact avec la partie basse de la queue via MED16, et MED14. MED16 organise la structure de la portion basse puisqu'il est en contact avec toutes les sous-unités. Les sous-unités de cette portion établissent des contacts avec MED14 et le module de tête. Un des rôles principaux du module de queue est de réguler la conformation du complexe et donc l'interaction qu'il établit avec la Pol II, bien qu'il n'y ait pas de preuves actuelles permettant de montrer que de tels réarrangements structuraux peuvent être provoqués par des FT se liant à des sous-unités de la queue.

Le module kinase est fait de 4 sous-unités : MED12/MED12L, MED13/MED13L, Cycline C, CDK8/CDK19. Chez les mammifères, MED12 et MED13 ont des paralogues appelés MED12L et MED13L, et CDK8 peut être remplacé par CDK19. Les protéines de ce module ont les mêmes caractéristiques que leurs homologues de levure.

5.3.3 Fonction dans l'initiation de la transcription

Le Médiateur est essentiel pour la transcription des gènes codants des protéines et la délétion individuelle de 10 de ses sous-unités est létale chez la levure (Holstege et al., 1998; Soutourina et al., 2011; Thompson and Young, 1995). Le complexe agit comme un coactivateur de la transcription, recruté par les FT au niveau des UAS/enhanceurs. A partir d'ici, le Médiateur a de nombreux rôles.

Tout d'abord, le Médiateur crée et maintient un pont fonctionnel entre les enhanceurs et les promoteurs proximaux. En effet, les FT doivent communiquer leurs signaux à la Pol II mais la plupart d'entre eux n'interagissent pas directement avec elle. De plus, surtout chez l'homme, les enhanceurs peuvent se situer très loin du promoteur proximal rendant impossible les contacts entre les deux régions sans réarrangement de la chromatine. Les FT interagissent alors avec le Médiateur, principalement avec son module de queue. Une des questions les plus importantes dans le domaine de la transcription est de savoir comment un complexe unique peut intégrer autant de signaux venant d'une centaine de protéines différentes. Actuellement, des PTM sont connues pour jouer un rôle dans la régulation des interactions entre le Médiateur et les FT. Beaucoup de sous-unités du Médiateur (17) portent des sites phosphorylables et les niveaux de phosphorylation varient en fonction des différents états cellulaires. Par exemple, chez la levure *S. cerevisiae*, Med15 phosphorylé empêche l'activation des gènes induits par le stress en condition sans stress, probablement en empêchant les interactions entre le Médiateur et les FT liés au stress (Miller et al., 2012). Le même type de régulation a été observé dans des cellules murines, où l'état de phosphorylation du FT ELK1 régule le recrutement du Médiateur (Mylona et al., 2016). La protéine kinase A et CDK8 ont été identifiées comme des enzymes qui phosphorylent MED13 et MED2 respectivement, régulant ainsi les fonctions du Médiateur (Chang et al., 2004).

Une fois que les FT ont contacté le Médiateur, ce dernier participe à la formation d'une boucle d'ADN permettant de rapprocher les enhanceurs du promoteur proximal, et il peut interagir avec le PIC pour stimuler son assemblage (figure 8) (Kagey et al.,

2010; Lai et al., 2013). Pour ce faire, le Médiateur coopère avec les complexes de cohésine, cette dernière pouvant physiquement connecter deux régions d'ADN distantes en formant des anneaux autour de celui-ci (Kagey et al., 2010). En effet, le Médiateur semble impliqué dans la formation d'un pont fonctionnel plutôt que physique puisque ces boucles enhanceur-promoteur ne disparaissent pas après sa déplétion, ni même après celle de la Pol II (El Khattabi et al., 2019). Certains ARNnc comme les ARN d'activation et les ARN enhanceurs peuvent participer à la formation de ces boucles (Lai et al., 2013).

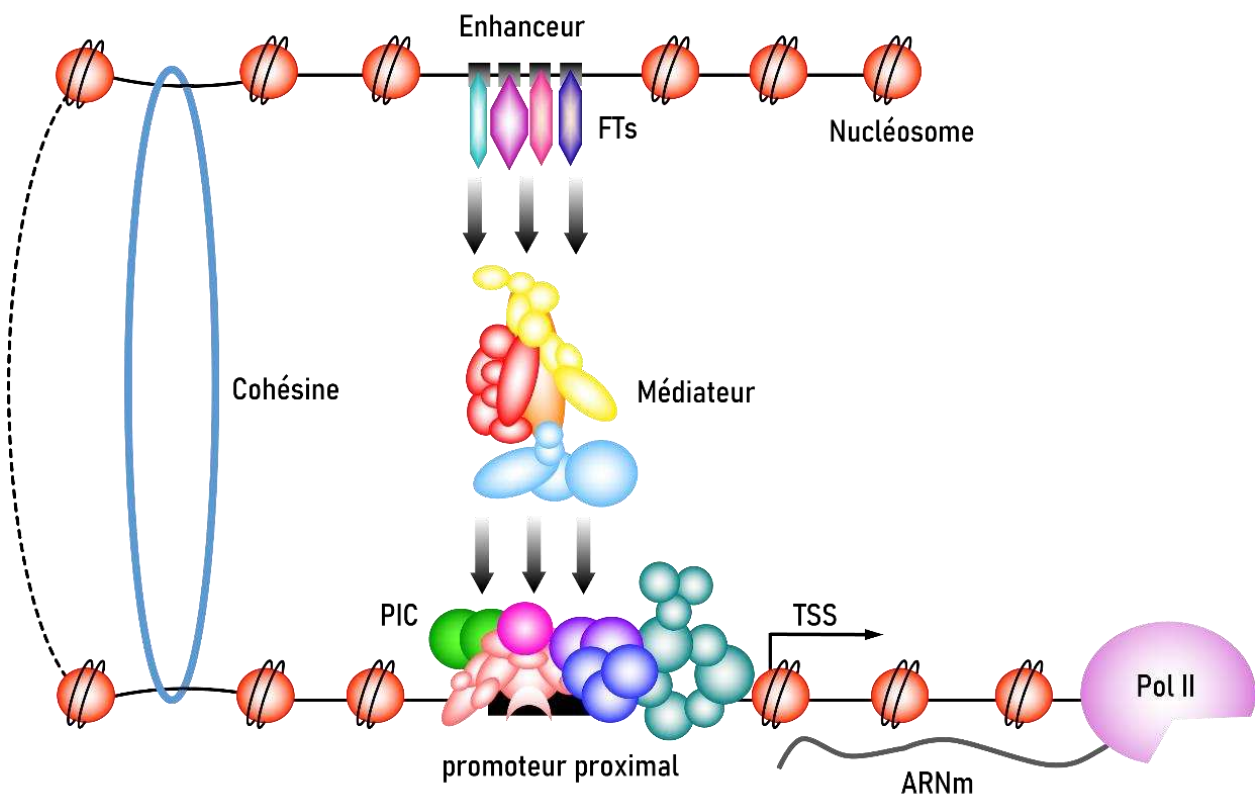


Figure 8. Interaction fonctionnelle entre l'enhanceur et le promoteur proximal (figure originale).

La cohésine connecte physiquement l'enhanceur au promoteur proximal tandis que le Médiateur les lie fonctionnellement. FTs : facteurs de transcription. PIC : complexe de pré-initiation. ARNm : ARN messenger. TSS : site de début de la transcription.

Le Médiateur participe ensuite au recrutement et à l'assemblage du PIC sur le promoteur (Eyboulet et al., 2015). Il recrute la Pol II via une interaction entre Med17 et Rpb3 (Soutourina et al., 2011). Beaucoup d'autres interactions entre le Médiateur et la Pol II ont été identifiées comme Med20 avec Rpb3/Rpb11 ; Med8, Med17 et Med22 avec Rpb4 ; Med9 avec Rpb1 ; et Med19 avec le CTD. De plus, des interactions entre des sous-unités du Médiateur avec d'autres composants du PIC ont été trouvées : Med10 et Med18 avec TFIIIB, Med11 et Med7 avec Rad3 et Med6 avec Tfb3 (TFIIH) (Baidooonso et al., 2007; Esnault et al., 2008; Eychenne et al., 2016; Kang et al., 2001; Plaschka et al., 2015; Rengachari et al., 2021; Schilbach et al., 2017; Tsai et al., 2017). Dans une étude structurale de microscopie cryo-électronique, huit contacts structuraux ont été observés entre le Médiateur et le PIC à une résolution d'environ 5 angströms : deux avec TFIIH, un avec TFIIIB et le reste avec la Pol II (Schilbach et al., 2017). De plus, on sait que le Médiateur interagit avec TFIIID (Johnson et al., 2002).

Avant l'élongation, le Médiateur stimule la phosphorylation du CTD par TFIIH et provoque donc l'échappement de la Pol II du promoteur (Boeing et al., 2010; Eyboulet et al., 2015; Kim et al., 1994). En effet, les interactions Médiateur-Pol II impliquent le bras, le crochet et la poignée du complexe, qui positionnent le CTD afin que CDK7 puisse le phosphoryler (Plaschka et al., 2015). Le Médiateur peut aussi activer la Pol II via un remodelage de ses interactions avec celle-ci qui serait provoqué par les FT (Meyer et al., 2010; Taatjes et al., 2002). Puisqu'il est essentiel pour la cellule et la transcription de l'ensemble des gènes dépendants de la Pol II, il pourrait être considéré comme un GTF.

L'initiation de la transcription n'a pas lieu sur un ADN nu dépourvu de nucléosomes, et donc le Médiateur doit agir en relation avec l'architecture de la chromatine sur les promoteurs. *In vitro*, des études ont montré que le Médiateur peut se lier à des nucléosomes acétylés et qu'il pourrait être impliqué dans l'expulsion des nucléosomes pour activer la transcription (Ansari et al., 2014; Kremer et al., 2012). De plus, l'assemblage du PIC médié par le Médiateur dépend de l'architecture du promoteur en termes d'occupation et dynamique des nucléosomes, ainsi que de la présence ou non d'un

élément TATA. Précisément, le Médiateur a plus d'effets sur les promoteurs qui contiennent une boîte TATA, qui présentent une faible occupation de nucléosomes, et qui contiennent des nucléosomes dynamiques en comparaison à ce qui est observé sur les gènes qui contiennent des éléments *TATA-like* (Eychenne et al., 2016; Soutourina, 2018).

5.3.4 Autres fonctions

En dehors de ses fonctions dans l'initiation de la transcription, le Médiateur a des rôles dans d'autres étapes transcriptionnelles, l'export des ARNm, la réparation de l'ADN et probablement l'organisation de la chromatine (André et al., 2021) (voir Annexe, revue).

5.3.4.1 *Fonction dans les étapes transcriptionnelles post-initiation*

Le Médiateur est impliqué dans les étapes transcriptionnelles post-initiation de différentes manières, notamment en stimulant la sortie de pause de la Pol II et en recrutant des facteurs d'élongation (Conaway and Conaway, 2013). En effet, MED26 a été montré comme pouvant permettre le recrutement de différents facteurs d'élongation, notamment P-TEFb et les membres de la famille ELL/EAF (Takahashi et al., 2011). Le module kinase permet aussi le recrutement de P-TEFb (Donner et al., 2010). Il s'associe avec le reste du complexe de manière transitoire via Med13, et permet de réguler l'interaction Médiateur-Pol II puisqu'il empêche cette dernière lorsqu'il est associé aux trois autres modules. C'est la raison pour laquelle le Médiateur est dépourvu de son module kinase durant une partie de l'initiation, étape durant laquelle il doit interagir avec la Pol II. En conséquence, cela suggère que le module pourrait agir après l'initiation, quand les contacts avec le complexe enzymatique sont rompus. Certains facteurs d'élongation ont été identifiés comme des substrats du module kinase comme par exemple NELF (Knuesel et al., 2009; Tsai et al., 2013), et l'inhibition de CDK8 augmente la pause de la Pol II, suggérant son rôle anti-pause (Steinparzer et al., 2019). De plus, la déplétion de MED23 dans des cellules murines embryonnaires

empêche son recrutement sur certains promoteurs et empêche la Pol II de sortir de son état de pause (Wang et al., 2005). Dans un système *in vitro* dépourvu de P-TEFb, le Médiateur est également capable de lever l'inhibition transcriptionnelle médiée par DSIF (Malik et al., 2007), et c'est aussi le cas concernant l'inhibition médiée par Gdown1, une protéine inhibitrice de la transcription stimulant un état pausé de la Pol II (Jishage et al., 2012). De plus, le Médiateur et TFIIIS coopèrent pour permettre le passage de la Pol II sur le nucléosome +1 *in vitro* (Nock et al., 2012).

5.3.4.2 Fonction dans l'export des ARN messagers

Pendant que les ARNm sont synthétisés par la Pol II, ils sont maturés par des facteurs co-transcriptionnels. Les ARNm matures sont ensuite exportés au cytoplasme via les pores nucléaires, qui sont associés au complexe d'export couplé à la transcription (TREX2, *transcription-coupled export complex*) (Jani et al., 2014). Le Médiateur interagit avec TREX2, liant ainsi la transcription à l'export via le pore nucléaire. En effet, la poignée du Médiateur est impliquée dans cette interaction via Med31 suite à la phosphorylation du CTD. TREX2 stimule aussi l'association du module kinase avec le reste du complexe (Schneider et al., 2015; Soutourina, 2018).

5.3.4.3 Fonction dans la réparation de l'ADN

Le Médiateur peut aussi lier la transcription à la réparation d'ADN. Premièrement, les délétions des gènes qui codent pour Med12, Med15 ou Med2 causent des sensibilités aux UVs. Deuxièmement, le Médiateur interagit physiquement et fonctionnellement avec Rad2/XPG sur les UAS, en facilitant son recrutement (Eyboulet et al., 2013; Georges et al., 2019). Rad2 est une endonucléase impliquée dans la réparation par excision de nucléotides (NER, *nucleotide excision repair*), qui est une voie de réparation se subdivisant en deux voies : la réparation du génome globale (GGR, *global genome repair*), pour les dommages ayant lieu n'importe où sur le génome, et la réparation couplée à la transcription (TCR, *transcription-coupled repair*), pour les dommages ayant lieu sur le corps des gènes transcrits. En effet, dans la TCR, le dommage bloque l'avancée de la Pol II sur le gène, ce qui déclenche

cette voie de réparation. Le Médiateur semble impliqué spécifiquement dans la TCR puisque des mutations qui le touchent entraînent des sensibilités aux UV seulement dans un contexte où la GGR n'est plus opérationnelle. De plus, le Médiateur et Rad2 interagissent avec TFIIH, qui est impliqué dans la transcription et la réparation de l'ADN ; et le Médiateur a été trouvé dans l'interactome de CSB (une protéine spécifique de la TCR) et de la Pol II après une irradiation aux UV (Boeing et al., 2016). Récemment, le lien du Médiateur avec les protéines de réparation a aussi été montré via Rad1-Rad10 et Rad26 (Gopaul et al., 2022).

5.3.4.4 *Fonction dans l'organisation de l'espace nucléaire*

Le Médiateur est en étroite relation avec l'architecture de la chromatine. En effet, ses actions sont dépendantes de cette architecture, par exemple en termes de modifications d'histones : l'acétylation sur H4K16 inhibe l'interaction entre le complexe et la chromatine (Zhu et al., 2011). De plus, une mutation de Med10 chez *S. cerevisiae* entraîne des défauts d'assemblage du PIC et de la transcription mais pas de la même manière sur tous les gènes : les gènes les plus affectés sont ceux pourvus d'un promoteur caractérisé par une faible occupation en nucléosomes autour du TSS, avec des nucléosomes -1 et +1 dynamiques (Eychenne et al., 2016).

Le Médiateur est aussi retrouvé spécifiquement sur les frontières des CID les plus fortes, en association avec des régulateurs de la chromatine comme les remodeleurs RSC et SWI/SNF ainsi que le facteur Ssu72 (Chereji et al., 2017). Dans des cellules souches neurales murines, il est retrouvé comme interagissant avec les modificateurs de la chromatine JMJD1C et CARM1, et avec les remodeleurs de la chromatine BAF et NuRD (Quevedo et al., 2019). Il participe également à la maintenance des boucles enhanceur-promoteur en coopération avec la cohésine (Kagey et al., 2010), et il est capable de lier les queues d'histones via Med17 et Med5 (Liu and Myers, 2012). Une étude *in vitro* a même montré que Med5 possède une activité acétyltransférase ciblant les histones (Lorch et al., 2000). On pourrait alors penser que le Médiateur joue un rôle dans l'organisation physique de la chromatine. En accord avec cette idée, une décompaction globale des gènes a été observée chez la levure

quand Med1 fut délété (Hsieh et al., 2015).

Le Médiateur participe aussi à l'organisation fonctionnelle de la chromatine. Il est retrouvé sur les super-enhanceurs et il a été montré qu'il pouvait stimuler la séparation de phase via ses IDR en coopération avec les FT, BRD4 et la Pol II hypophosphorylée. En effet, les IDR de MED1 peuvent former des gouttelettes en séparation de phase *in vitro* et pourraient alors être responsables de la formation de condensés moléculaires *in vivo*, particulièrement sur les super-enhanceurs. La formation de ces condensés sur les régions régulatrices permet alors de séparer fonctionnellement l'initiation transcriptionnelle de l'élongation (Boija et al., 2018; Cho et al., 2018; Guo et al., 2019; Hnisz et al., 2017; Sabari et al., 2018; Zamudio et al., 2019).

5.3.5 Implication dans les maladies

Puisqu'il a des fonctions essentielles dans la régulation des programmes transcriptionnels spécifiques à chaque cellule, un dysfonctionnement du Médiateur peut mener à l'établissement et au maintien d'un large spectre de maladies comme des troubles du développement, des maladies cardiovasculaires et des cancers (Tableau 7).

Tableau 7. Implications dans les maladies des sous-unités du Médiateur (Spaeth et al., 2011).

Sous-unité	Maladie	Etat génétique
MED1	Cancers de la prostate et du sein Mélanome	Surexpression
	Cancers du côlon et du poumon	Sous-expression
MED4	Cancer utérin Rétinoblastome	Sous-expression
MED12	Syndrome FG	Mutation R971W
	Syndrome de Lujan	Mutation N1007S
	Leiomyome utérin	Mutations de l'intron 1 + exon 2
	Syndrome d'Ohdo	Mutation faux sens

	Schizophrénie	Polyphormisme
	Cancer du sein	-
	Cancer du côlon	Mutation de l'exon 2
	Cancer du poumon	Sous-expression
	Cancer de la prostate	Mutation
MED13	Transposition des grandes artères	Translocation chromosomique
	Cancer du cerveau	Mutation
	Cancer du sein	Amplification génique
	Rétinoblastome	-
MED14	Cancer du sein	-
	Cancer de la prostate	Surexpression
MED15	Syndrome de DiGeorge	Délétion chromosomique
	Cancer du sein	-
	Cancer de la prostate	Hyperméthylation
MED17	Atrophie cérébrale infantile	Mutation L371P
	Cancer de la prostate	Surexpression
MED19	Cancers de la rate, du sein, du côlon, des poumons, de l'estomac, des ovaires, de la prostate, du pancréas, de la langue et ostéosarcomes	Surexpression
MED23	Invalidité intellectuelle	Mutation R617Q
	Mélanome	Délétion chromosomique
	Cancer du sein	-
	Cancer de l'estomac	Mutation
	Phéochromocytome	Sous-expression
	Cancer du poumon	Surexpression
MED24	Cancer du sein et de la prostate	Surexpression
MED25	Maladie de Charcot-Marie Tooth	Mutation A335V
MED28	Cancers du sein, du côlon et de la prostate	Surexpression
MED29	Cancer du pancréas	Surexpression
MED30	Cancer du sein	Surexpression
CDK8	Cancer du côlon et mélanome	Surexpression
Cycline C	Cancer du côlon et du foie	Surexpression
	Leucémie	Délétion chromosomique
	Ostéosarcome	Sous-expression
CDK19	Pli de la rétine congénital, microcéphalie et retard	Inversion chromosomique péricentrique

	mental	
	Myélome	Mutation
	Ostéosarcome	Surexpression

La maladie de Charcot-Marie-Tooth est un trouble du système nerveux périphérique dont la forme axonale récessive autosomale (ARCMT2, *autosomal recessive axonal form*) est rare mais sévère. La mutation faux sens A335V dans MED25 a été identifiée comme une cause probable de la maladie qui perturbe l'interaction de MED12 avec les sous-unités de la queue du Médiateur (Leal et al., 2009; Zhao et al., 2021).

L'atrophie cérébrale infantile et l'atrophie cérébelleuse accompagnée d'une faible myélinisation peuvent être causées par la mutation faux sens L371P dans MED17. La version mutée de la protéine est incapable de compléter une souche qui porte une mutation thermosensible sur *med17* pour la croissance chez la levure. La mutation perturbe la dynamique du module de tête et peut perturber les gènes du développement oligodendrocytaire (Kaufmann et al., 2010).

Les syndromes de Lujan et FG sont associés à un retard mental lié au chromosome X. Ils ont été liés à des mutations individuelles dans MED12, respectivement les mutations non-sens R961W et N1007S. Les mutations peuvent perturber le rôle de MED12 dans le développement du cerveau en altérant les voies Notch, Wnt et sonic hedgehog. De plus, ces mutations perturbent l'inhibition épigénétique médiée par REST, ce qui provoque la mise en place de programmes transcriptionnels non adaptés (Risheg et al., 2007). MED12 peut aussi être impliqué dans la schizophrénie, un trouble mental associé à de nombreux symptômes comme des hallucinations, l'altération des processus cognitifs et des comportement sociaux (Graham and Schwartz, 2013).

Le pli rétinale congénital, la microcéphalie et le retard mental peuvent être associés au variant humain de CDK8 : CDK19. En effet, une inversion péricentrique d'une copie sur le chromosome VI cause une haplo-insuffisance de CDK19 qui ne peut alors plus remplir ses fonctions. CDK19 est important pour le développement des neurones, des yeux et des dendrites (Mukhopadhyay et al., 2010).

La transposition des grandes artères est une maladie

congénitale commune dans laquelle MED13L est impliqué suite à une translocation chromosomique entraînant l'haplo-insuffisance, ou suite à l'apparition de mutations faux-sens (E251G, R1872H, D2023G) (Muncke et al., 2003).

Le syndrome de DiGeorge est un des syndromes congénitaux multiples les plus communs. Il est associé à plusieurs microdélétions sur le chromosome XXII, dont une qui affecte MED15, responsable de la dérégulation des programmes développementaux (Kobrynski and Sullivan, 2007).

Beaucoup de syndromes et de maladies présentées ci-dessus causées par des altérations du Médiateur engendrent des troubles mentaux qui partagent de nombreuses conséquences phénotypiques, si bien qu'on peut les regrouper sous le terme de "médiateurpathies" (Caro-Llopis et al., 2016; Moore-Morris et al., 2018).

Le développement du cancer du sein peut être stimulé par l'hormone stéroïdienne oestrogène E2 et ses récepteurs α (ER α) et β (ER β). La liaison de E2 à ses récepteurs active des gènes liés au cancer via l'association avec le Médiateur. En effet, MED1 peut être surexprimée dans les cellules cancéreuses du sein à cause d'une amplification génique. Il peut aussi participer au développement du cancer via la voie de signalisation JAK/STAT3, ce qui mène à l'activation de gènes stimulant la prolifération. MED28 est aussi impliqué dans les cancers du sein et son inhibition arrête la prolifération des cellules *in vivo*. Le même phénomène a été observé avec MED19 (Li et al., 2011a; Yoon et al., 2010; Zhang et al., 2004; Zhu et al., 1999).

Le début du cancer de la prostate est stimulé par des androgènes et leurs récepteurs. MED1 est un transducteur pour la signalisation dépendante de ces hormones et est impliqué dans le mécanisme de la maladie. Comme dans le cancer du sein, MED1 peut être retrouvée surexprimée dans la maladie, mais pas pour les mêmes raisons. Dans le cancer de la prostate, MED1 est stabilisé par une MAP kinase via une phosphorylation, ce qui améliore sa fonction dans l'initiation de la transcription. MED1 et MED28 sont souvent trouvés surexprimés dans ce type de cancer et leur délétion entraîne l'apoptose (Li et al., 2002; Vijayvargia et al., 2007; Zhang et al., 2004).

Le développement du cancer du côlon peut être stimulé par

l'activité de CDK8. En effet, CDK8 phosphoryle la β -caténine qui en retour active des gènes associés à la prolifération cellulaire. De plus, cela inhibe l'apoptose médiée par E2F1, qui active indirectement la β -caténine puisque E2F1 est son inhibiteur dans la cellule (Firestein, 2008).

Dans les cancers du poumon, MED1 peut avoir des fonctions anticancéreuses puisque son expression augmente la survie. De plus, avec MED23, ils contrent le développement métastatique. Sa suppression tumorale empêche le Médiateur d'interagir avec des activateurs transcriptionnels qui stimulent l'expression de deux suppresseurs de tumeurs : DAPK1 et KiSS-1 (Ndong et al., 2009).

MED19 est surexprimée dans les cancers du poumon avec une haute sévérité. Sa déplétion entraîne une réduction de la prolifération *in vitro* et de la tumorigénicité *in vivo* (Sun et al., 2011).

Dans les cancers du pancréas, MED29 a des fonctions oncogéniques et suppressives de tumeurs (Kuuselo et al., 2011).

En plus d'être impliqué dans des maladies développementales et des cancers, le Médiateur est une cible physique et fonctionnelle des protéines activatrices des virus : ces derniers reprogramment alors l'appareil transcriptionnel de la cellule hôte pour la latence virale, l'évasion immunitaire et la réplication lytique. C'est le cas des protéines EA1 de l'adénovirus et VP16 du virus de l'herpès, tout comme beaucoup d'autres protéines associées à des virus pathogènes comme l'herpes virus associé au sarcome de Kaposi, le virus varicella-zoster et le virus bunyamwera (Boyer et al., 1999; Gwack et al., 2003; Léonard et al., 2006; Mittler et al., 2003; Roupelieva et al., 2010; Spaeth et al., 2011; Yang et al., 2004, 2008).

Les poches hydrophobes du Médiateur avec lesquelles il interagit avec les FT sont des cibles intéressantes pour des raisons thérapeutiques. Par exemple, quand une interaction entre un FT et le Médiateur est bloquée, le résultat biologique est le même qu'obtenu lorsqu'on inhibe le FT directement (Nishikawa et al., 2016). A l'inverse, des petites molécules ont été créées pour mimer les FT et lier les poches hydrophobes du Médiateur (Rowe and Mapp, 2008). Cette stratégie peut être utile pour traiter les infections fongiques résistantes aux médicaments (Nishikawa et al., 2016).

5.4 RSC/PBAF

RSC est un complexe de remodelage de la chromatine impliqué dans la formation des NDR et leur maintenance sur les promoteurs pour l'initiation de la transcription. Il peut transloquer l'ADN tout en étant lié aux nucléosomes, ce qui a pour effet de les faire glisser ou de les expulser de la chromatine.

5.4.1 RSC chez *S. cerevisiae*

5.4.1.1 Découverte

Le premier remodeleur de la chromatine à avoir été étudié chez la levure fut SWI/SNF. Ensuite, des protéines homologues à sa sous-unité catalytique Snf2 ont été identifiées et parmi elles était Sth1. Sth1 fut alors déterminée comme la sous-unité catalytique d'un complexe homologue : RSC (*Remodels the Structure of Chromatin*) (Laurent et al., 1992).

RSC fut découvert en 1996 comme un complexe ATP-dépendant de 15 sous-unités, capable de remodeler les nucléosomes. Il partage une homologie avec SWI/SNF et forme une famille de remodeleurs avec ce dernier (qui s'appelle SWI/SNF également). Cependant, alors que SWI/SNF est peu présent dans la cellule et facultatif pour la croissance mitotique, RSC est 10 fois plus abondant et essentiel pour la survie cellulaire (Cairns et al., 1996).

5.4.1.2 Structure et organisation

Des études biochimiques ont permis d'obtenir des données structurales sur RSC, seul ou en contact avec un nucléosome, par spectrométrie de masse et par microscopie cryo-électronique à des résolutions d'environ 7, 15 et 19 angströms (Baker et al., 2021; Patel et al., 2019; Suka et al., 2001; Wagner et al., 2020).

RSC est fait de 15 sous-unités dont une est la sous-unité catalytique : Sth1 (Tableau 3 et figure 9). Le complexe peut se trouver sous deux formes alternatives dans la cellule, contenant soit Rsc1, soit

Rsc2. Environ 90 % des complexes contiennent Rsc2 plutôt que Rsc1 (Cairns et al., 1999).

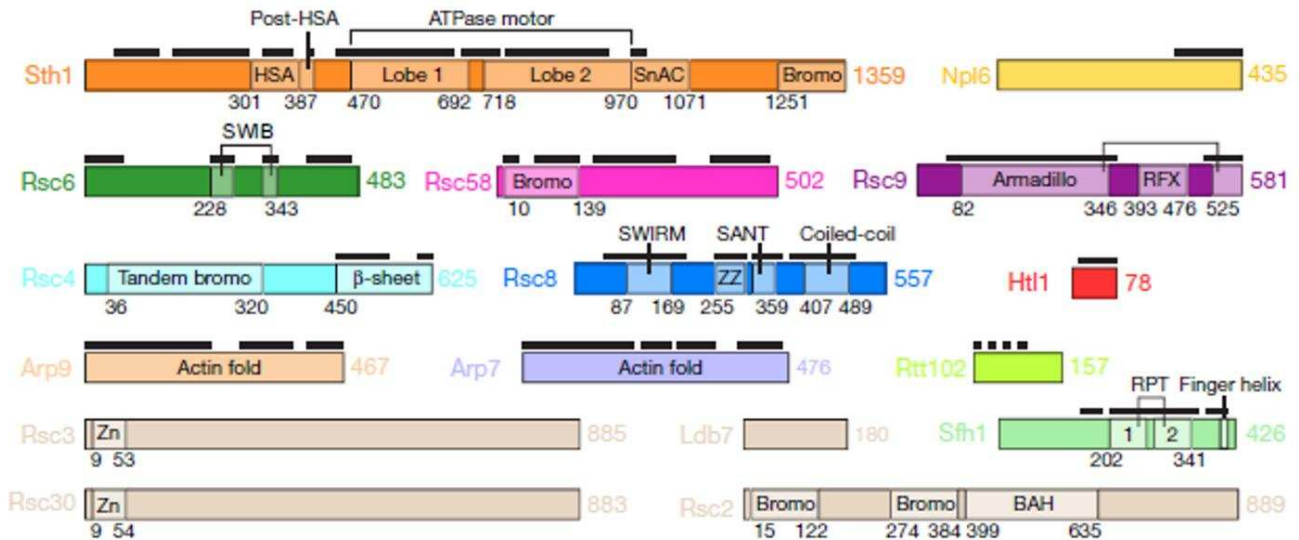


Figure 9. Composition des sous-unités de RSC (Wagner et al., 2020).

HSA: helicase-SANT-associated. armadillo: armadillo repeat fold. RFX: DNA-binding RFX-type winged helix. ZZ: ZZ-type zinc-finger. SANT: Swi3 Ada N-Cor TFIIIB. Zn : Zn²-C6 fungal-type zinc-finger. RPT: repeat.

La structure du complexe peut être décomposée en cinq modules : le module ATPase, le module des protéines semblables à l'actine, le corps, le bras et le module d'interaction avec l'ADN. Les études structurales montrent que RSC enveloppe les nucléosomes en les contactant sur le côté ainsi que sur leurs deux faces (figure 10).

Le module ATPase correspond à la région C-terminale de Sth1 jusqu'à son domaine HSA et interagit avec l'extrémité des nucléosomes. Son domaine de couplage à l'ATP (SnAc, *Snf2-ATP coupling*) lie la face externe du nucléosome et est conservé à travers les espèces. Le domaine moteur ATPasique contient deux lobes qui contactent l'ADN à la LSH+2 et LSH-6 (voir plus haut, figure 3). Le domaine post-HSA régule l'activité ATPase et la translocation d'ADN.

Le module de corps contient Rsc4, Rsc6, Rsc8, Rsc58, Htl1 et la

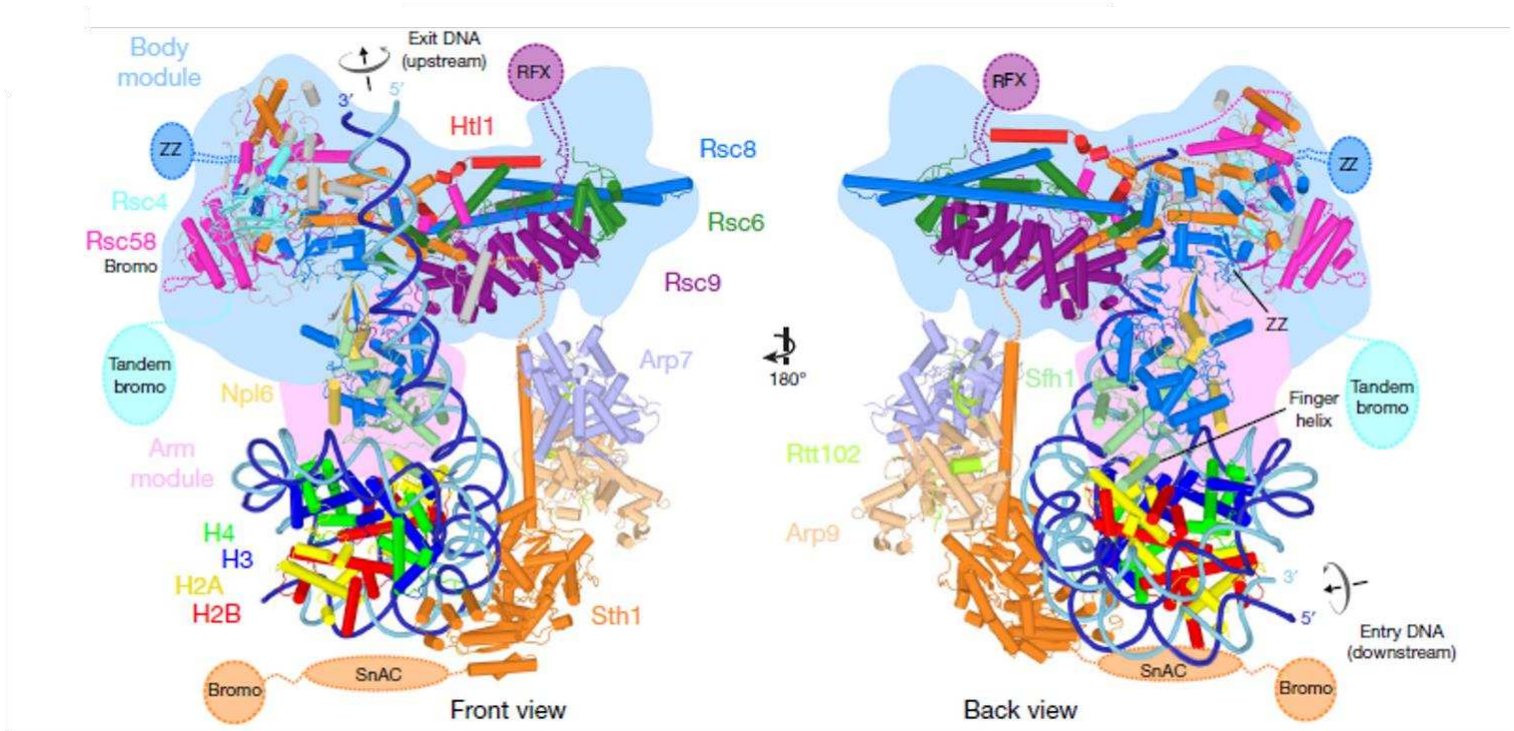
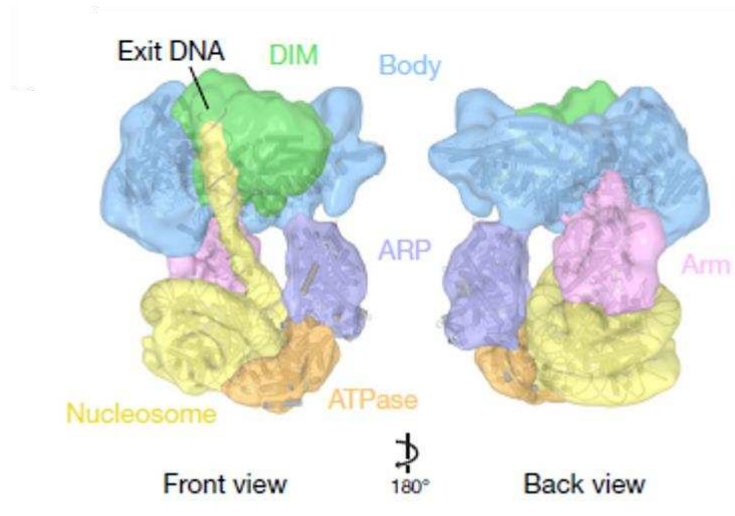


Figure 10. Architecture de RSC (Wagner et al., 2020).

En haut : les modules de RSC sont représentés de différentes couleurs. Le nucléosome avec l'ADN sortant est représenté en jaune. En bas : représentation schématique des protéines dans RSC. DIM: DNA-interacting module. ARP: actin-related proteins. ZZ: ZZ-type-zinc-finger. bromo: bromodomain. SnAC: snf2-ATP coupling. RFX: DNA-binding RFX-type winged helix.

région N-terminale de Sth1. Une partie dénommée le bras sort du

corps, elle est composée de Sfh1, Npl6, Rsc9 et de certaines parties de Rsc8. Le corps et le bras sont connectés par Rsc8, présent en double exemplaire dans le complexe. La partie N-terminale de Rsc8 qui contient le domaine SWIRM occupe le bras, tandis que les domaines SANT, ZZ zinc-finger et les hélices C-terminales sont localisés dans le corps.

Le bras interagit avec les nucléosomes en contactant leur surface interne via le doigt d'hélice (*finger helix*) de Sfh1. Ce doigt d'hélice est fait de quatre résidus arginine (R397, R400, R401 et R404) hautement conservés chez les eucaryotes qui interagissent avec une poche acide sur l'octamère d'histone. De plus, le doigt d'hélice peut contribuer à la sélection du substrat. En effet, les nucléosomes qui contiennent les variants H2A.Z sont préférentiellement liés par RSC, et cela pourrait être dû grâce à leur poche acide plus large, qui a donc une affinité plus grande pour Sfh1. H2A.Z a aussi une queue en C-terminal unique qui protrude proche de Sfh1, qui pourrait alors le lier plus facilement (Wagner et al., 2020).

Le module ARP est fait des régions HSA de Sth1, Arp7, Arp9 et Rtt102. Il assure le couplage de l'activité ATPasique à la translocation, régulant ainsi l'activité de remodelage. En effet, le module est mobile et peut facilement changer de position, ce qui change la conformation du lobe 1 du domaine moteur et donc ses interactions avec l'ADN. Il est lié au corps du complexe.

Le module d'interaction avec l'ADN (DIM, *DNA interacting module*) contient des parties de Rsc2, Rsc3 et Rsc30. Il interagit avec l'ADN sortant des nucléosomes environ 20 à 40 pb en amont de la LSH-7, protégeant ainsi environ 50 pb d'ADN extranucléosomal de la dégradation par les nucléases. L'interaction entre le DIM et l'ADN peut expliquer comment RSC reconnaît des séquences d'ADN spécifiquement enrichies au niveau des promoteurs. En effet, Rsc3 et Rsc30 reconnaissent l'élément CGCG localisé en amont du TSS, qui est très proche du nucléosome +1 lié par RSC. Rsc1 et Rsc2 s'excluent mutuellement du complexe. Ils ne sont pas requis pour la croissance cellulaire mais la délétion des deux est létale (Cairns et al., 1999).

RSC a six domaines d'interactions avec les queues d'histones : le bromodomaine en N-terminal de Rsc58 situé dans le corps, le

bromodomaine de Sth1, deux bromodomaines dans Rsc2 ainsi que son domaine de liaison à H3 (le domaine BAH), et les bromodomaines en tandem de Rsc4 qui interagissent avec H3 acétylé. Il a aussi cinq domaines d'interaction avec l'ADN : les domaines zinc-finger de Rsc3 et Rsc30, le domaine RFX de Rsc9 et le domaine ZZ zinc-finger d'une des deux sous-unités de Rsc8.

5.4.2 PBAF chez les mammifères

SWI/SNF et RSC ont des homologues chez l'homme, appelés BAF et PBAF, respectivement. PBAF et RSC partagent une grande homologie. Ils lient les nucléosomes et organisent leurs sous-unités auxiliaires de la même manière (Yuan et al., 2022). La famille BAF chez l'homme contient, en plus de ces deux complexes, le complexe BAF non canonique (BAFnc). De plus, des variants de ces trois complexes principaux sont retrouvés dans certains types cellulaires.

5.4.2.1 Découverte

Le complexe des facteurs associés à BRG1 (BAF, *Brg1-associated factors*) fut identifié la première fois comme un homologue humain de SWI/SNF et était montré comme capable de remodeler les nucléosomes et d'activer la transcription (Armstrong, 1998; Kwon, 1994; Wang 1996). En 2001, un nouveau facteur multiprotéique était purifié et était montré comme nécessaire en combinaison avec les FT, les GTF, et le Médiateur, pour stimuler la transcription active *in vitro* sur un modèle chromatinien. Le complexe purifié contenait des sous-unités homologues aux sous-unités de BAF, cependant il contenait la sous-unité BAF180 mais pas BAF250. BAF180 était donc spécifique au nouveau complexe puisqu'absente de BAF, tandis que c'était l'inverse pour BAF250. Ce nouveau complexe fut nommé BAF associé aux polybromo (PBAF, *Polybromo-associated BAF*). De plus, PBAF ne pouvait pas être remplacé dans un système *in vitro* par BAF et ACF, montrant ainsi qu'il avait des fonctions uniques (Lemon et al., 2001). La sous-unité PBAF-spécifique BAF180 possède des motifs structuraux uniques qui peuvent être retrouvés dans RSC mais pas dans SWI/SNF : ce sont les régions adjacentes aux bromodomaines et

les bromodomaines de Rsc1, Rsc2 et Rsc4. De plus, PBAF était montré comme pourvus de fonctions similaires à celles de RSC dans le cycle cellulaire. En conséquence, PBAF fut déterminé comme homologue de RSC (Xue et al., 2000).

5.4.2.2 *Structure et organisation*

PBAF contient 12 sous-unités (Tableau 3) et a un poids moléculaire d'environ 1,2 MDa. Il est fait d'homologues de Sth1, Rsc6, Rsc8, Sfh1, Arp7 et Arp9, tandis qu'il possède des équivalents pour Rsc2, Rsc4 et Rsc9. De plus, les modules ATPases, de liaison à l'actine et le bras de RSC sont conservés chez PBAF, mais pas le DIM. Le complexe s'organise en trois modules principaux : le moteur, le module de liaison aux protéines semblables à l'actine, et le module de recrutement des substrats (SRM, *substrate recruitment module*). Des études structurales par microscopie cryo-électronique ont permis d'obtenir des données sur le complexe seul ou en association avec le nucléosome, à une résolution de 3 angströms (figure 11) (Leschziner et al., 2005; Wagner et al., 2020; Yuan et al., 2022).

BRG1 est l'homologue humain de Sth1 et constitue le module moteur. Il adopte une conformation fermée pour interagir fortement avec le nucléosome, comme chez la levure. Le domaine SnAc contacte aussi la poche acide des nucléosomes.

La plupart des sous-unités auxiliaires se situent dans le SRM, qui est lui-même divisé en trois sous-modules : le lobe de liaison au nucléosome (LLN), le lobe de liaison aux histones (LLH) et le lobe de liaison à l'ADN (LLA) (figure 12). Le LLN lie les nucléosomes via la région C-terminale de BAF47 et contient aussi le domaine ARID de BAF200.

Le LLH est fait d'un cœur qui contient la région N-terminale de BRG1, la partie C-terminale de BAF60a, et un domaine SANT de BAF155 ou BAF170. A la périphérie, il contient aussi BAF180, BAF45a et BRD7. BRD7 est au bout du LLH et interagit avec les régions C-terminales de BAF180 et BAF45a. Ces trois protéines sont impliquées dans la reconnaissance de l'histone H3.

Le LLA est fait de BAF155, BAF170, BAF60a, BAF57 et BAF200. Tandis que BAF200 a un domaine qui lie spécifiquement des

séquences d'ADN, BAF60a et BAF57 interagissent avec des FT qui interagissent avec l'ADN. Le domaine ARID de BAF200 interagit avec le LLN et sa partie C-terminale est proche de l'extrémité de l'histone H2A, suggérant un potentiel rôle dans la reconnaissance des queues d'histones.

A travers différentes études, différents noms ont été donnés aux protéines de PBAF. Ils sont récapitulés dans le tableau suivant (voir page suivante).

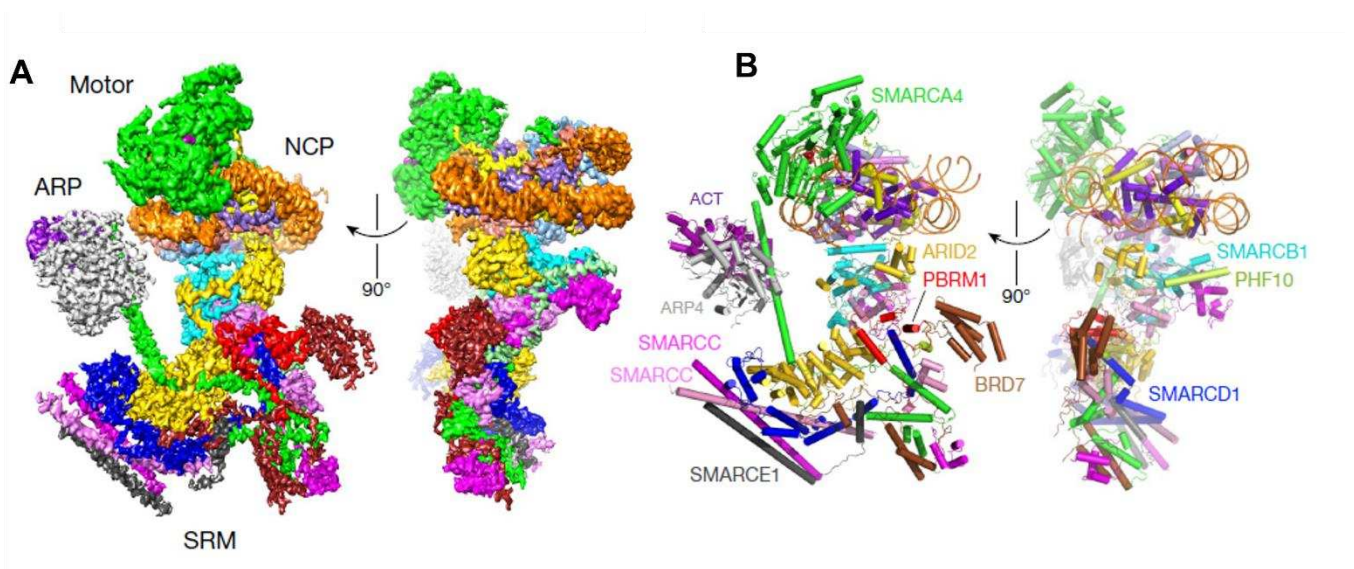


Tableau 8. Sous-unités de PBAF et leurs différents noms les plus communs.

Sous-unité	Nom alternatif
BRG1	SMARCA4
BAF155	SMARCC1
BAF170	SMARCC2
BAF180	PBRM1
BAF200	ARID2, SMARCF3
BAF57	SMARCE1
BAF60a	SMARCD1
BAF47	SMARCB1
BAF45a	PHF10, SMARCG4
BRD7	SMARCI1

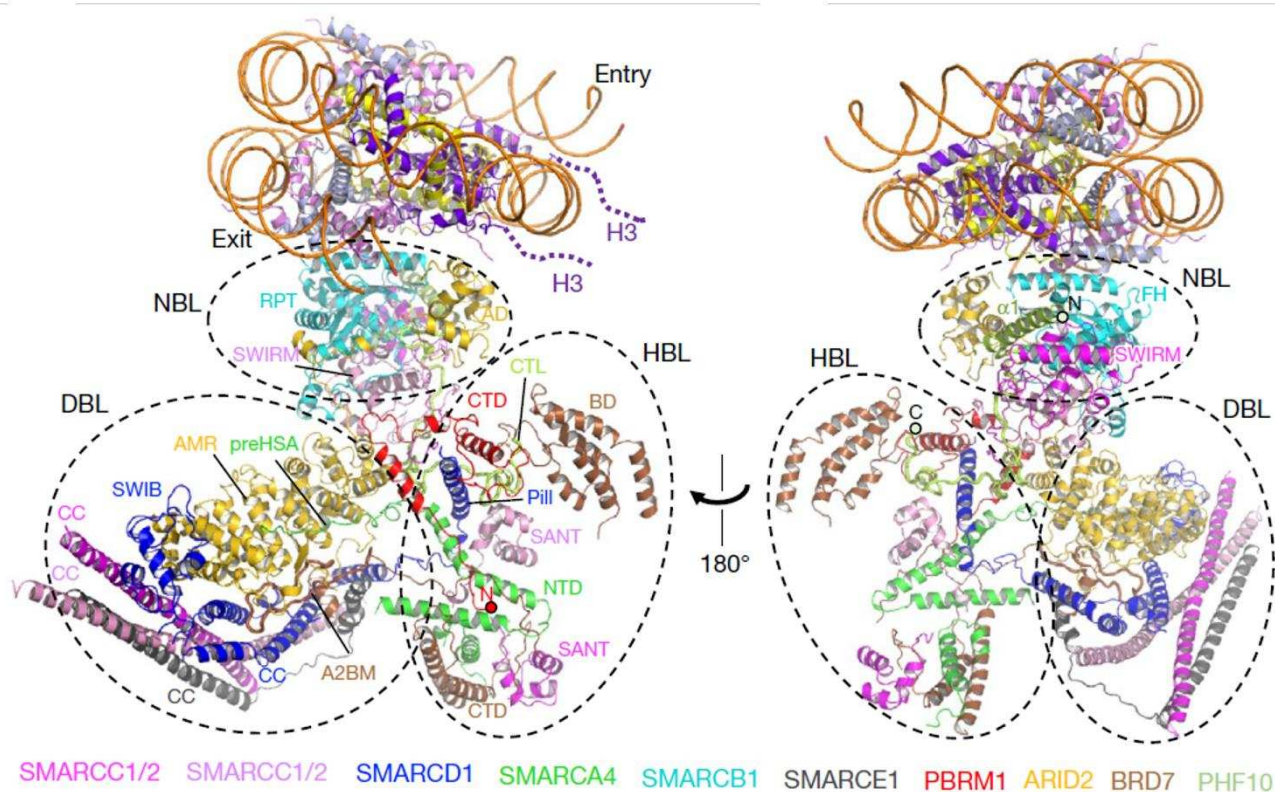


Figure 12. Structure du SRM de PBAF (Yuan et al., 2022).

La structure du module de recrutement des substrats est représentée avec ses trois lobes : le lobe de liaison au nucléosome (NBL), le lobe de liaison aux histones (HBL), et le lobe de liaison à l'ADN (DBL). Le nucléosome est représenté en orange en haut des représentations. Le nom alternatif des différentes sous-unités est donné dans le tableau 8.

5.4.3 Processus de remodelage

RSC a cinq fois la masse moléculaire d'un nucléosome et possède une grande cavité centrale dans laquelle le dernier se positionne pour le remodelage. Cela se fait via le déplacement d'ADN par RSC : Sth1 tire l'ADN d'un côté du nucléosome et le renvoie de l'autre (Saha et al., 2006; Zofall et al., 2006), ce qui fait glisser le nucléosome sur l'ADN (Lorch et al., 2011) ou l'expulse (Lorch et al., 1999).

Initialement, il y avait deux hypothèses qui ont été proposées pour expliquer comment RSC agissait pour déplacer ou expulser les nucléosomes de l'ADN : ces mécanismes étaient nommés "la diffusion de torsion" et "le déplacement de boucle" (figure 13) (Bowman, 2010). Les deux impliquaient une perturbation locale des

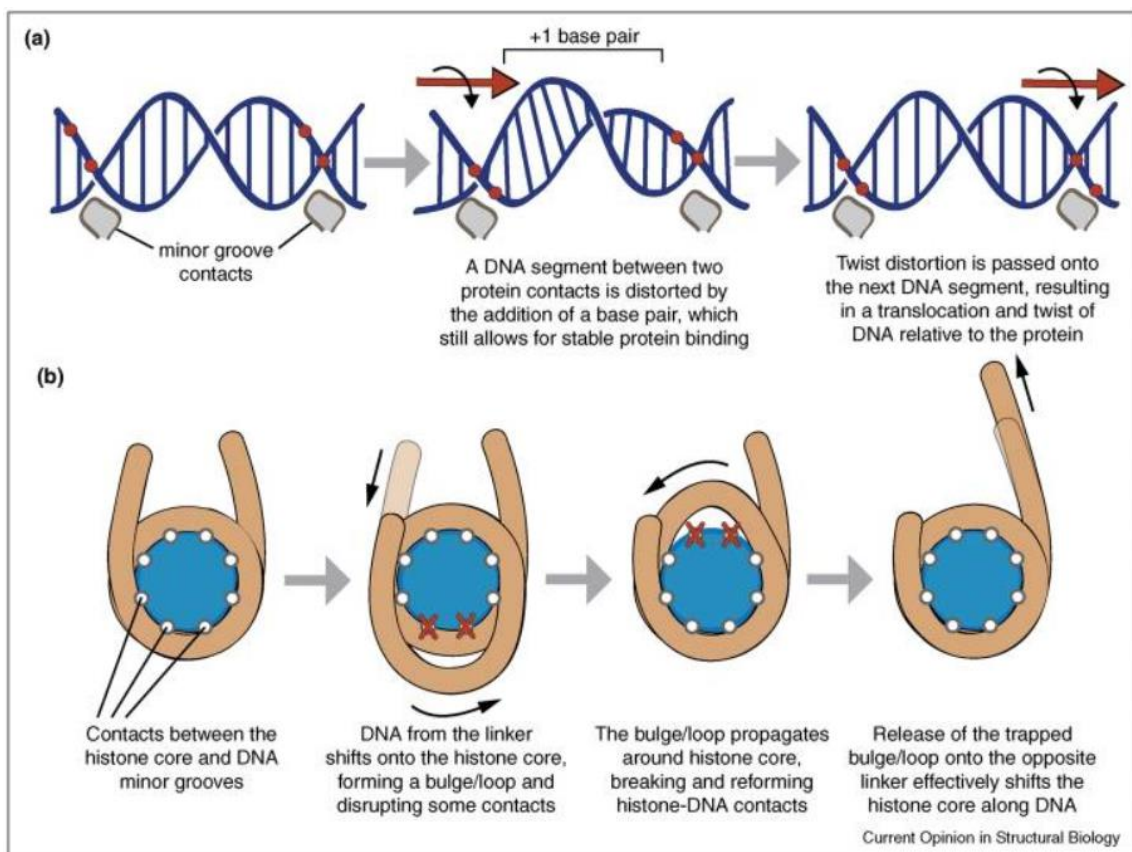


Figure 13. Représentation des mécanismes de diffusion de torsion (a) et de propagation de boucle (b) (Bowman, 2010).

contacts histone-ADN se propageant à travers le nucléosome. Pour la diffusion de torsion, on pensait qu'une torsion d'une pb perturbait un ou quelques contacts histone-ADN, qui pouvaient se reformer une fois que la torsion s'était déplacée sur le nucléosome. C'est le même mécanisme qui était proposé pour le déplacement de boucle mais on pensait que plusieurs pb étaient impliquées dans la rupture des contacts histone-ADN plutôt qu'une seule. Cependant, on sait désormais que ni l'un ni l'autre de ces mécanismes n'est responsable du mouvement des nucléosomes sur l'ADN (Lorch and Kornberg, 2017; Lorch et al., 2005). A la place, les nucléosomes liés par RSC se trouvent en équilibre entre deux états : l'un où l'ADN nucléosomal est complètement lié au nucléosome, et l'autre où l'ADN est complètement lié à RSC (figure 14). L'ADN nucléosomal chargé négativement peut s'insérer dans la cavité de RSC chargée positivement et osciller entre des interactions avec le complexe puis les histones. Ce modèle peut aussi expliquer pourquoi les séquences riches en AT aident dans le recrutement de RSC. En effet, comme elles sont rigides, leur déroulement du nucléosome fait gagner de l'énergie au système. En conséquence, quand l'ADN nucléosomal est lié à RSC, le déplacement peut survenir plus facilement car plusieurs contacts entre l'ADN et les histones sont rompus. De plus, cela permet des interactions entre l'ADN et des protéines. Par exemple, pour le nucléosome +1, l'ATPase contacte la LSH+2 et l'ADN est éjecté en amont de sorte que le nucléosome se déplace en aval. C'est le procédé inverse pour le nucléosome -1 (Clapier et al., 2017; Wagner et al., 2020). Les nucléosomes dits asymétriques et fragiles sont dans cet état de liaison à RSC (Brahma and Henikoff, 2019; Kubik et al., 2015; Lorch and Kornberg, 2017).

5.4.4 Fonction dans la transcription

RSC est impliqué dans la transcription d'un grand nombre de gènes transcrits par la Pol II et la Pol III, dont des gènes du métabolisme, de réponse au stress, de synthèse de la membrane cellulaire, des facteurs associés au ribosome, de la fonction mitochondriale et de la progression du cycle cellulaire (Damelin et al., 2002). RSC est notamment nécessaire à la régulation de la voie de

signalisation TOR, et son activité dépend de sa composition : en effet, il permet la régulation des gènes de l'autophagie seulement quand il est composé de Rsc1 et non de Rsc2 (Damelin et al., 2002; Yu et al., 2015).

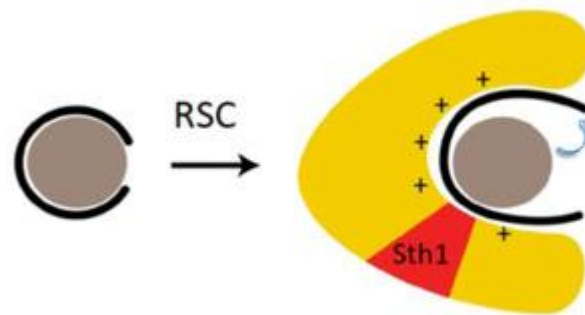


Figure 14. Modèle actuel de remodelage par RSC (Lorch et Kornberg, 2017).

Quand RSC lie le nucléosome (droite), l'ADN nucléosomal (noir) est dans un état dynamique d'interaction avec le cœur d'histones (marron) et la cavité de RSC chargée positivement (jaune).

RSC interagit avec Rpb5 via sa sous-unité Rsc4 *in vitro* et *in vivo*, Rpb5 étant une sous-unité partagée par les trois ARN polymérases nucléaires. De plus, Rsc1 interagit avec Rpb10 dans un système double hybride, cette dernière sous-unité étant aussi partagée par les trois complexes enzymatiques (Soutourina et al., 2006). La perte du complexe provoque une baisse générale de la transcription dans les cellules, affectant l'expression de tous les gènes (Parnell et al., 2008). De manière intéressante, dans des mutants *rsc* on trouve des gènes induits mais aussi réprimés par rapport à la souche sauvage, soulignant son rôle en tant que coactivateur ou corépresseur de la régulation transcriptionnelle (Soutourina et al., 2006).

5.4.4.1 Initiation de la transcription

RSC est présent sur environ 10 % des promoteurs chez la levure, prenant en compte les gènes qui codent pour des protéines et ceux des ARN de transfert. Il est d'abord recruté sur les régions régulatrices par les FT et par des modifications spécifiques de la

chromatine, comme les acétylations d'histones. Tandis qu'il est recruté par des activateurs sur certains gènes, il peut aussi être recruté par des répresseurs, comme c'est le cas sur les gènes qui codent pour les histones par exemple. En conséquence, il est présent sur le promoteur de gènes actifs et inactifs (Ng et al., 2002).

Le complexe peut aussi cibler des modifications d'histones spécifiques, comme le fait Rsc4 : cette sous-unité cible les histones H3 acétylés sur la lysine 14 et peut ensuite stimuler l'activation des gènes associés. Ses bromodomaines en tandem sont essentiels pour la viabilité, soulignant leur importance pour les fonctions de RSC (Kasten et al., 2004).

Après son recrutement sur les régions régulatrices, RSC doit agir sur le promoteur proximal pour permettre l'assemblage du PIC. En effet, une étude a montré que RSC liait le promoteur avant TFIIB sur certains gènes, suggérant son rôle dans l'initiation transcriptionnelle (Ng et al., 2002). De la même manière, Rsc3 a été montré comme facilitant la liaison des facteurs d'initiation sur le locus *GAL1/GAL10* (Floer et al., 2010). Des études structurales ont également prédit que RSC pouvait lier la chromatine où la taille de l'ADN nu entre deux nucléosomes était d'au moins 40 pb. Puisque cette taille est d'environ 23 pb en moyenne chez la levure, cela pourrait expliquer pourquoi RSC occupe préférentiellement les régions promotrices qui ont une densité en nucléosomes plus faible en comparaison aux autres régions (Wagner et al., 2020). De plus, il a été montré que Rsc3 et Rsc30 liaient le promoteur proximal dans la NDR, environ 100 pb en amont du TSS (Badis et al., 2008). RSC lie aussi les nucléosomes -1 et +1, qui sont alors caractérisés comme asymétriques puisqu'ils perdent partiellement les contacts ADN-histone du fait de la nouvelle interaction entre l'ADN et la cavité du complexe. En conséquence, l'ADN enroulé devient plus accessible. De la même manière, les nucléosomes fragiles résidants dans les promoteurs, qui cachent souvent un motif pour un FT essentiel au niveau de leur dyade, sont dans un processus de remodelage médié par RSC (Kubik et al., 2015; Ramachandran et al., 2015; Rhee et al., 2014).

Quand les sous-unités de RSC sont mutées, la structure de la chromatine sur certains gènes montre une plus grande densité en

nucléosomes. Cela empêche le recrutement de la Pol II, des GTF, et inhibe la transcription. Cela a été observé dans une souche thermosensible *rsc4-ts* sur les gènes *DUT1* et *SMX3*, dans laquelle l'interaction entre Rsc4 et Rpb5 était alors impossible (Soutourina et al., 2006). Cela a aussi été observé sur le promoteur d'*ARG1* où le recrutement de la TBP fut réduit (Govind et al., 2005). Bien qu'on pourrait se demander si les perturbations de l'organisation de la chromatine sur le promoteur ont été causées par une diminution de la transcription, l'accessibilité à la chromatine sur les promoteurs ne fut pas affectée dans un mutant de la Pol II alors que la transcription était grandement réduite. En conséquence, il semblerait que les effets induits par les mutations de RSC au niveau des promoteurs soient la cause des effets transcriptionnels observés (Soutourina et al., 2006).

Afin de permettre le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base, RSC crée et maintient des NDR sur les promoteurs où il se trouve (figure 15) (Lorch et al., 2011). *In vitro*, il peut former la NDR à partir d'ADN et d'histones seulement avec l'aide d'une séquence poly dA:dT et de GTF. Il peut aussi pousser le nucléosome +1 vers l'extérieur de la NDR d'environ 10 à 20 pb, rendant ainsi le TSS accessible (Krietenstein et al., 2016). En effet, RSC est aussi responsable du positionnement des nucléosomes -1 et +1 (Ramachandran et al., 2015; Rhee et al., 2014).

Pour créer les NDR, RSC peut expulser des nucléosomes fragiles de l'ADN se situant sur les promoteurs. Ces nucléosomes ont été déterminés comme tels puisque l'ADN qui s'enroule autour d'eux est plus sensible à la MNase que celui de leurs pairs. En effet, par MNase-seq, l'ADN nucléosomal de ces particules n'est visible qu'à une faible digestion, tandis qu'à une digestion moyenne qui permet de voir la plupart des autres nucléosomes, cet ADN disparaît à cause d'une surdigestion (Chereji et al., 2019). Ce phénomène peut être expliqué car ces nucléosomes sont en fait remodelés par RSC et perdent certains de leurs contacts avec l'ADN. De fait, l'ADN est plus accessible à l'enzyme et se dégrade plus facilement. Ces nucléosomes peuvent alors être expulsés plus rapidement. En effet, la déplétion de Sth1 entraîne leur disparition et cause l'apparition de particules stables au niveau des anciennes NDR des promoteurs (Kubik et al., 2015). L'expulsion de ces nucléosomes permet l'exposition de motifs

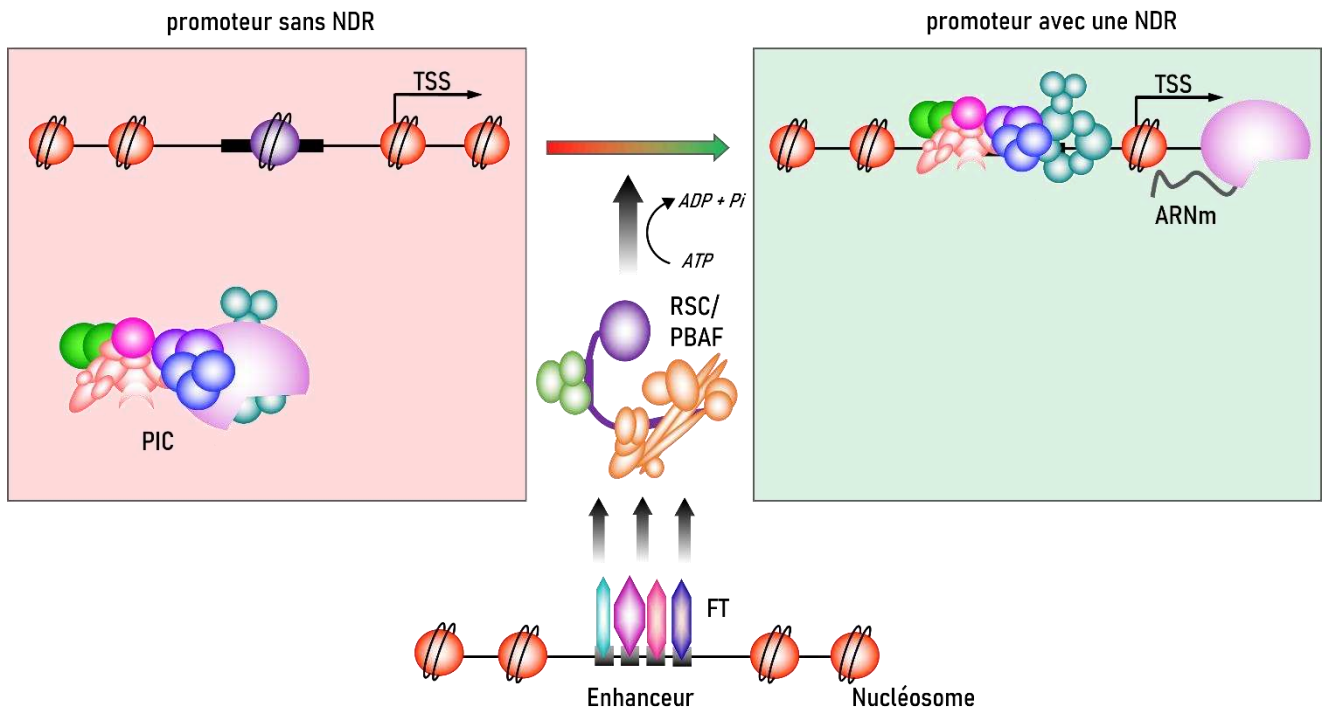


Figure 15. Représentation simplifiée de la formation d'une NDR par RSC/PBAF (figure originale)

Avant l'intervention de RSC/PBAF, un nucléosome peut se trouver sur le promoteur, bloquant ainsi l'accès aux facteurs initiateurs de la transcription à leur séquence cible (rectangle noir) (gauche). Via l'hydrolyse de l'ATP, RSC/PBAF peut expulser ce nucléosome et ainsi créer une NDR, permettant la liaison des facteurs d'initiation (droite). PIC : complexe de préinitiation. FTs : facteurs de transcription. TSS : site de début de la transcription.

d'ADN spécifiques de certains FT essentiels pour la transcription des gènes (Lorch and Kornberg, 2017). RSC crée aussi des NDR sur les UAS, exposant ainsi des motifs pour d'autres FT également (Angus-Hill et al., 2001; Badis et al., 2008).

Les PTM d'histones peuvent réguler l'activité de RSC ou sa liaison à l'ADN. Par exemple, l'acétylation d'histone médiée par SAGA ou NuA4 peut empêcher RSC d'expulser un nucléosome *in vitro* (Lorch et al., 2018). De plus, l'ubiquitination de H2B contre la fonction de RSC car l'ubiquitine interfère avec l'interaction entre le bras de RSC et le nucléosome (Wagner et al., 2020).

5.4.4.2 Élongation de la transcription

En plus d'être recruté sur les promoteurs pour l'initiation de la transcription, RSC est présent sur les régions codantes des gènes, qu'ils soient faiblement ou fortement transcrits, mais les gènes les moins transcrits semblent être plus dépendants de RSC que les autres (Spain et al., 2014). Globalement, l'occupation de RSC sur les régions codantes corrèle avec la transcription et l'occupation de la Pol II. Il peut être ciblé sur ces régions par des complexes acétylateurs d'histones comme SAGA et NuA4, les kinases de la sérine 2 du CTD Bur1 et Ctk1, la MAP kinase Hog1, et les histones acétylées qui se trouvent en aval de la Pol II. SAGA et NuA4 ne recrutent pas directement RSC mais le font via l'acétylation des histones H3 et H4. De la même manière, Bur1 et Ctk1 doivent phosphoryler la sérine 2 du CTD, qui recrute en retour Spt6 et Paf1 chargés du recrutement de RSC (Mas et al., 2009; Spain et al., 2014).

RSC cible les régions codantes pour lier les nucléosomes et les expulser transitoirement en collaboration avec les chaperons d'histones, permettant ainsi d'augmenter le taux d'élongation. En effet, dans des études de MNase-seq, l'ADN nucléosomal associé à RSC peut être inférieur à 140 pb après digestion, suggérant que les nucléosomes sont remodelés et sont dans un état semblable à ceux du promoteur. Quand l'occupation de RSC est réduite sur les régions codantes, le taux d'élongation et l'expulsion des histones sont réduits également (Ginsburg et al., 2009). De plus, quand Sth1 est déplété du noyau, la Pol II est stabilisée sur les régions codantes malgré une réduction significative de la liaison de TBP sur les promoteurs associés, suggérant que l'enzyme est bloquée par les nucléosomes (Biernat et al., 2021; Spain et al., 2014).

RSC coopère avec les chaperons d'histones Nap1 et FACT de sorte qu'ils rétablissent la structure de la chromatine après le passage de la Pol II. En effet, RSC et Nap1 stimulent la transcription via les nucléosomes *in vitro* en expulsant les dimères H2A/H2B (Hsu et al., 2019). Le même phénomène a été observé avec FACT et la rétention d'hexamères sur l'ADN. RSC pourrait alors stimuler la formation d'hexamères durant l'élongation avec l'aide des chaperons d'histones (Jamai et al., 2009; Pavri et al., 2006).

5.4.5 Autres fonctions

A travers son activité de remodelage, RSC est impliqué dans d'autres processus liés à l'ADN, comme la réparation et la réplication.

En effet, un mutant *sth1-ts* montre une sensibilité à divers agents endommageant l'ADN (Koyama et al., 2002). Précisément, RSC est présent des deux côtés des cassures double brins pour recruter le complexe MRN, qui lie l'ADN près des cassures afin d'enclencher la voie de réparation Tel1/ATM et Mec1/ATR (Chai et al., 2005). Rsc1 et Rsc2 sont requis pour la réparation des cassures double brins, mais pas au même stade du processus. Rsc2 est requis pour l'ubiquitination de PCNA, qui est une protéine essentielle impliquée dans la réplication nécessitant d'être ubiquitinylée quand un dommage à l'ADN est rencontré (Shim et al., 2007). Il est également requis pour l'expulsion des nucléosomes autour de la cassure et pour le recrutement des protéines de réparation, tandis que Rsc1 est requis pour le déplacement des nucléosomes qui permet de les éloigner de la cassure (Chambers et al., 2012; Shim et al., 2005).

RSC contenant Rsc2 est généralement présent sur les fourches de réplication (Niimi et al., 2012). Il est aussi impliqué dans la ségrégation des chromosomes (Hsu et al., 2003), et la transition G2/M via la régulation de l'architecture de la chromatine sur les centromères. Les mutants de RSC montrent aussi des défauts de cohésion des chromatides (Cao et al., 1997, Tsuchiya 1998).

5.4.6 Implication dans les maladies

Puisqu'ils ont des fonctions essentielles dans la régulation des programmes transcriptionnels physiologiques, les complexes BAF/PBAF sont impliqués dans un grand nombre de maladies.

Premièrement, des mutations dans les complexes BAF/PBAF peuvent mener à des maladies neurodéveloppementales.

Le syndrome de Coffin-Siris est un trouble du développement cérébral principalement caractérisé par une incapacité intellectuelle, un retard de croissance, des malformations des articulations et des organes. Le gène le plus fréquemment muté responsable de la

maladie est *BAF250B* (dans 68 % des cas) (Santen et al., 2013). Des mutations dans les sous-unités catalytiques BRM et BRG1 ainsi que dans la sous-unité auxiliaire BAF47 sont aussi connues pour être impliquées dans la maladie (Kosho et al., 2014).

Le syndrome de Nicolaïdes-Baraitser est un trouble d'incapacité intellectuelle caractérisé par des crises, des malformations articulaires, une lenteur de la parole, un retard de croissance et des stigmates faciaux. La cause principale de son apparition vient de mutations dans BRM, sous-unité homologue de BRG1 que peut contenir BAF (Van Houdt et al., 2012). Il y a beaucoup d'autres maladies neurodéveloppementales liées à BAF comme le syndrome de Kleefstra, les troubles du spectre de l'autisme, la sclérose latérale amyotrophique et la schizophrénie (Chesi et al., 2013; Kleefstra et al., 2012; Koga et al., 2009; Neale et al., 2012).

Les complexes BAF/PBAF sont aussi grandement impliqués dans les cancers, puisque 20 % des cancers humains portent des mutations sur au moins une de ses sous-unités (Kadoch et al., 2013). Très souvent, ces mutations touchent le domaine ATPase, le domaine des protéines semblables à l'actine ou le module de bras, qui sont tous les trois proches du nucléosome (Wagner et al., 2020). Deux cas de cancers liés à BAF ont été grandement étudiés et montrent que les complexes ont des fonctions oncogéniques et suppressives de tumeurs.

Les tumeurs rhabdoïdes sont des tumeurs malignes agressives touchant le cerveau, les tissus mous ou les reins qui arrivent durant l'enfance précoce. Elles sont caractérisées par une perte biallélique de BAF47 dans presque 100 % des cas (Versteeg et al., 1998). Les complexes dépourvus de BAF47 sont toujours ciblés sur la chromatine mais sont incapables d'expulser les complexes répresseurs polycomb comme ils le devraient (Kadoch et al., 2017). En conséquence, ces complexes déposent des marques répressives sur des gènes suppresseurs de tumeurs comme sur le locus P16/INK4, ce qui entraîne l'apparition de cancers (Oruetebarria et al., 2004; Wilson et al., 2010). De plus, toutes les sous-unités spécifiques de BAFnc ont été déterminées comme essentielles pour la survie des cellules cancéreuses rhabdoïdes puisqu'elles préservent l'expression de gènes associés au développement de la tumeur (Michel et al., 2018). Dans

d'autres types de cancers, les quatre résidus du doigt d'hélice de BAF47 qui interagissent avec les nucléosomes sont retrouvés mutés (Wagner et al., 2020). Il y a d'autres types de cancers dans lesquels BAF perd sa fonction de suppresseur de tumeur comme c'est le cas dans les cellules cancéreuses des ovaires, où BRG1 est muté dans 90 % des cas (Ramos et al., 2014). C'est aussi le cas avec des mutations de BAF250a dans les cancers de l'endomètre, gastro-intestinaux, pancréatiques et les cholangiocarcinomes (Biankin et al., 2012; Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013; Varela et al., 2011; Wang et al., 2011, 2011) ; c'est le cas avec des mutations de BAF170 dans les cancers gastriques et colorectaux (Kim et al., 2013) ; dans les cancers des poumons à non petites cellules avec des mutations de BAF155 (Kadoch et al., 2013) et dans les cancers du sein avec des mutations de BAF45d et BAF60 (Lessard et al., 2007; Stephens et al., 2012).

A l'inverse, les sarcomes synoviaux sont des tumeurs où BAF porte une fonction oncogénique. Ces cancers sont des tumeurs des tissus mous dans lesquels une seule mutation est caractérisée chez tous les patients : la translocation chromosomique t(X;18) fusionnant 78 acides aminés de la protéine SSX à la sous-unité de BAF SS18 (Clark et al., 1994; Kadoch and Crabtree, 2013). La protéine de fusion SS18-SSX est alors incorporée dans BAF, menant à une expulsion incontrôlée de PRC2 d'oncogènes (Kadoch et al., 2017; McBride et al., 2018). Les sarcomes synoviaux sont aussi dépendants de BRD9.

Beaucoup d'inhibiteurs d'EZH2 sont actuellement testés dans des études cliniques pour tenter de contrer le développement des tumeurs rhabdoïdes. Les inhibiteurs de BRD9 sont développés également pour contrer la progression des sarcomes synoviaux (Brien et al., 2018; Fioravanti et al., 2018; Gulati et al., 2018).

6 RÉSULTATS

6.1 CONTEXTE DE TRAVAIL

La transcription est un processus cellulaire hautement régulé, faisant intervenir un grand nombre de protéines, notamment lors de son étape d'initiation. Les FT permettent en effet le recrutement d'un large spectre de complexes coactivateurs, qui portent des fonctions spécifiques permettant d'activer la transcription d'un gène cible. Le Médiateur et RSC sont deux de ces coactivateurs. Alors que le premier stimule l'assemblage du PIC, le second est un remodeleur de la chromatine responsable de la formation et la maintenance des NDR sur les promoteurs. De nombreux autres coactivateurs sont connus tels que des modificateurs de la chromatine, d'autres remodeleurs, et tous les autres facteurs qui participent à l'assemblage du PIC. Bien qu'ils aient tous des fonctions spécifiques, ils doivent se coordonner et coopérer pour initier correctement la transcription. C'est par exemple le cas des modificateurs de la chromatine NuA4 et SAGA qui régulent l'activité de RSC (Lorch et al., 2018) ; ou encore des composants du PIC et des FT qui interagissent directement avec le Médiateur (Eyboulet et al., 2015; Soutourina, 2018).

Dans un système *in vitro*, le Médiateur humain, TFIID et PBAF ont été montré en coopération pour l'activation de la transcription (Lemon et al., 2001). Cependant, une potentielle coopération directe entre RSC et le Médiateur n'a pas été étudiée à ce jour, même si on sait qu'ils se situent tous les deux sur les régions régulatrices des gènes et qu'ils sont recrutés par les FT (Ng et al., 2002; Soutourina, 2018). De plus, les deux complexes co-occupent les frontières des CID chez la levure (Chereji et al., 2017) et leur distribution génomique corrèlent dans des cellules souches murines embryonnaires (de Dieuleveult et al., 2016). RSC est aussi retrouvé dans l'interactome du Médiateur dans des cellules souches neurales de souris (Quevedo et al., 2019).

Au début des années 2000, un crible double-hybride au laboratoire a permis d'identifier trois interactions physiques entre le Médiateur et RSC : Med17 avec Rsc8, Med21 avec Rsc3 et Med11

avec Rsc30, soulevant la question de leur rôle physiologique. A partir de ces interactions, **les objectifs de ma thèse furent de confirmer le lien physique entre le Médiateur et RSC, et de mettre en évidence l'existence d'un lien fonctionnel s'établissant entre eux chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.** J'ai aussi commencé à étudier de telles interactions chez l'homme en utilisant les cellules HeLa.

Premièrement, nous avons étudié l'interaction physique entre les deux complexes par double-hybride et par co-immunoprécipitation (CoIP). Dans le système double-hybride, nous avons cherché à confirmer les trois interactions préalablement observées dans le crible : nous avons pu en confirmer deux (l'interaction entre Med11 et Rsc30 fut celle que je n'ai pas pu reproduire). Dans l'expérience de CoIP, j'ai immunoprécipité Rsc8-Myc et j'ai regardé si Med14 pouvait être détecté dans l'immunoprécipitat par western blot. Les expériences menées dans ce projet ont nécessité des constructions de souches, notamment l'ajout d'un tag Myc aux sous-unités Rsc8 et Sth1 de RSC, et Med14 de Médiateur. Nous avons choisi de cibler Med14 en tant que représentant du Médiateur puisque c'est une sous-unité essentielle qui permet de structurer le complexe dans son entier. Concernant RSC, nous avons décidé de travailler avec Sth1 car c'est la sous-unité catalytique du complexe, responsable du remodelage des nucléosomes *per se*, et nous avons aussi travaillé avec Rsc8 car c'est une sous-unité essentielle au complexe qui a été identifiée comme interagissant directement avec le Médiateur dans le système double-hybride.

Ensuite, nous avons voulu comparer la distribution génomique des deux complexes. J'ai donc réalisé des immunoprécipitations de la chromatine suivies d'une analyse par PCR quantitative (ChIP-qPCR) ou d'un séquençage (ChIP-seq). Ici encore, j'ai travaillé avec Sth1 et Rsc8 afin de cibler le complexe RSC, et avec Med14 pour cibler le Médiateur, toutes ces sous-unités portant un tag Myc. Pour les ChIP-qPCR, j'ai sélectionné différentes régions à étudier dont des UAS, des promoteurs proximaux, et des régions codantes. A l'inverse, le séquençage m'a permis d'obtenir les informations sur tout le génome, et donc de réaliser des analyses globales, notamment sur

les régions régulatrices des gènes. Des ChIP-seq de la Pol II ont aussi été réalisés afin d'évaluer la transcription des gènes.

En parallèle des ChIP-seq du Médiateur et de RSC, j'ai réalisé des expériences de MNase-seq afin d'observer la distribution des nucléosomes sur le génome, notamment au niveau des promoteurs, ainsi que leur positionnement relatif par rapport aux deux complexes. La digestion de la chromatine et les analyses bio-informatiques ont été réalisées de sorte à ne garder que les particules mononucléosomales, puisque c'est le positionnement individuel de chaque nucléosome qui m'intéressait.

Après avoir étudié l'interaction physique entre les deux complexes ainsi que leur occupation et celle des nucléosomes dans un contexte sauvage, j'ai utilisé les avantages de la génétique de la levure et réitéré ces expériences dans des contextes mutants des sous-unités du Médiateur et de RSC. Tout d'abord, j'ai utilisé deux mutants thermosensibles de RSC que nous avons reçu du laboratoire de Charles Boone : *sth1-ts* (P646L, F655L, D657G, N1077S, F1125L) et *rsc8-ts* (G326D, I417F, K446M) (Li et al., 2011b), principalement pour analyser les effets de ces mutations sur l'occupation du Médiateur et sur les NDR au niveau des promoteurs, ainsi que l'interaction physique entre les deux complexes. Ensuite, j'ai utilisé des mutants thermosensibles de la sous-unité Med17 du Médiateur, sous-unité essentielle au complexe impliquée dans l'interaction avec RSC via Rsc8 : *med17-140* (M442L, Q444P) et *med17-444* (Q444P) (Eyboulet et al., 2013, 2015; Georges et al., 2019). De même ici, je voulais étudier si des mutations du Médiateur pouvaient affecter l'interaction physique entre les deux complexes, l'occupation de RSC sur les régions régulatrices, ainsi que l'architecture des promoteurs en termes de positionnement des nucléosomes.

En parallèle de ces études sur la levure bourgeonnante, j'ai commencé à investiguer la conservation d'une potentielle coopération entre le Médiateur et l'homologue humain de RSC, PBAF. J'ai utilisé les cellules HeLa afin de réaliser des expériences de CoIP entre les deux complexes : j'ai immunoprécipité MED17 pour cibler le Médiateur et j'ai regardé par western blot la présence de PBAF en ciblant sa sous-unité spécifique ARID2/BAF200. J'ai aussi réalisé l'immunoprécipitation inverse, en ciblant tout d'abord ARID2/BAF200

et en observant la présence de MED17 et MED14 dans l'immunoprécipitat.

Alors que les complexes SWI/SNF et RSC sont très différents l'un de l'autre et ne partagent que peu de sous-unités, c'est l'inverse pour les trois complexes humains principaux de la famille BAF qui ne se différencient les uns des autres que par quelques-unes seulement (Michel et al., 2018). En conséquence j'ai aussi cherché à savoir si nous pouvions observer une interaction physique par CoIP entre le Médiateur et BAF puis BAF non canonique, en ciblant leurs sous-unités spécifiques ARID1A/BAF250A et GLTSCR1, respectivement.

L'ensemble des expériences chez la levure m'a tout d'abord permis de voir que les deux complexes se trouvent sur les promoteurs des gènes, dans les NDR, que ce soit dans le contexte sauvage ou dans les différents contextes mutants. Dans les mutants de RSC, de manière attendue, j'ai pu observer une perturbation de l'architecture des NDR qui se sont trouvées plus étroites que dans le contexte sauvage. Mais le résultat majeur de ma thèse se trouve sans doute dans l'observation du mutant du Médiateur *med17-140*, dans lequel les NDR qui sont liées par les deux complexes se retrouvent remplies par un nucléosome, qui se centre sur les pics d'enrichissement de RSC et du Médiateur. Les résultats sont présentés ci-dessous, et mettent en évidence une coopération jusqu'alors inconnue entre le Médiateur et RSC dans la maintenance des NDR au niveau des promoteurs (voir chapitre 5.2 Article). De plus, l'interaction physique entre les deux complexes semble être conservée chez l'homme, et s'observe aussi avec les complexes BAF et BAF non canonique (voir chapitre 6.3 Résultat supplémentaire – Interaction physique dans les cellules humaines).

Note à propos de ma contribution dans la réalisation des expériences et la rédaction de l'article : J'ai réalisé toutes les expériences humides présentées dans l'article ainsi que celles sur les cellules humaines qui figurent dans le manuscrit de thèse. J'ai notamment reçu de l'aide pour le système double-hybride et pour la construction des souches nécessaires aux immunoprécipitations. J'ai également réalisé toutes les analyses bio-informatiques de mes données de séquençage après

avoir reçu une formation de l'Institut Français de Bio-informatique, avec l'aide ponctuelle des bio-informaticiens du laboratoire. J'ai participé activement à la rédaction de l'article. J'ai principalement pris en charge la réalisation des figures, la rédaction de la partie « matériels et méthodes » et des données supplémentaires.

6.2 ARTICLE

Voir page suivante.

Functional interplay between Mediator and RSC chromatin remodeling complex controls nucleosome-depleted region maintenance at promoters

Kévin M. André¹, Nathalie Giordanengo Aiach¹, Veronica Martinez-Fernandez¹, Leo Zeitler¹, Arach Goldar¹, Michel Werner², Cyril Denby Wilkes¹, and Julie Soutourina^{1,3*}

¹*Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France*

²*Université Paris Cité, CNRS, Institut Jacques Monod, 75013 Paris, France*

³*Lead contact*

**Correspondence: julie.soutourina@cea.fr*

Keywords: Mediator; RSC; RNA polymerase II; transcription; nucleosome-depleted region; genome-wide distribution

Running title: Interplay between Mediator and RSC in NDR formation

Summary (150 words)

Chromatin organization is crucial for the transcriptional regulation in eukaryotes. Mediator is an essential and conserved coactivator thought to act in concert with chromatin regulators. However, it remains largely unknown how their functions are coordinated. Here, we provide evidence in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* that Mediator establishes physical contact with RSC (Remodels the Structure of Chromatin), a conserved and essential chromatin remodeling complex that is crucial for nucleosome-depleted region (NDR) formation. We determined the role of Mediator-RSC interaction in their recruitment, nucleosome occupancy and transcription on a genomic scale. Mediator and RSC co-localize on wide NDRs of promoter regions, and specific Mediator mutations affect nucleosome eviction and TSS-associated +1 nucleosome stability. This work shows that Mediator contributes to RSC remodeling function to shape NDRs and maintain chromatin organization on promoter regions. It will help in our understanding of transcriptional regulation in the chromatin context relevant for severe diseases.

Introduction

Eukaryotic DNA is compactly structured through chromatin organization which governs and influences all DNA transactions. Regulation of transcription is a key phenomenon of gene expression whose alterations lead to severe human pathologies. Multisubunit coregulator complexes constitute a key regulatory layer operating between specific transcription factors and basal RNA polymerase (Pol) II transcription machinery. These complexes can act on chromatin structure as chromatin modifiers or remodelers, or stimulate the assembly of the preinitiation complex (PIC). Some of them could have both functions. Many coregulator complexes are thought to cooperate. However, their functional interplay remains poorly understood.

Mediator is one of the essential and conserved coactivator complexes. The discovery of the Mediator complex three decades ago has revolutionized the field of transcription regulation (Kornberg, 2005). This key transcriptional coregulator transmits the regulatory signals from transcription factors to Pol II machinery and stimulates the PIC assembly in conjunction with the general transcription factors (Soutourina, 2018). Mediator is a huge complex (1.5 MDa) conserved in all eukaryotes and composed of 25 subunits in yeast, and of up to 30 subunits in human. Med17 is one of the ten essential Mediator subunits in yeast and mutations in this subunit globally affect Pol II transcription (Eyboulet et al., 2013; Eyboulet et al., 2015; Georges et al., 2019; Soutourina et al., 2011). In humans, given a key role of the Mediator complex in transcriptional regulation, mutations that affect Mediator subunits lead to various pathologies. Mediator is thought to activate transcription in concert with other coactivators including chromatin remodelers that alter the chromatin structure. However, the molecular mechanisms involved remain unknown. RSC (Remodels the Structure of Chromatin) is a multisubunit complex of the conserved SWI/SNF family of ATP-dependent chromatin remodelers (Clapier et al., 2017). It is composed of 16 subunits, is essential for cell viability in yeast and 10-fold more abundant than SWI/SNF complex, another remodeler of the same family. Two distinct

human remodeling complexes BAF (Brg1 Associated Factors) and PBAF (Polybromo-associated BAF) are homologous to yeast SWI/SNF and RSC, respectively. A third complex closely related to BAF and PBAF, named ncBAF (non-canonical BAF complex) was recently identified in mammalian cells (Michel et al., 2018). An important role of BAF and PBAF complexes is highlighted by the fact that mutations of BAF/PBAF subunits have been linked to several diseases including cancers. ATP-dependent chromatin remodeling complexes and RSC in particular play a key role in the establishment of the promoter nucleosome-depleted regions (NDR) and nucleosome positioning on a genomic scale (Hartley and Madhani, 2009; Krietenstein et al., 2016; Kubik et al., 2018; Lorch et al., 2018; Yen et al., 2012; Zhang et al., 2011). Chromatin remodeling activity of RSC allows nucleosome sliding, destabilization or eviction (Clapier et al., 2016; Lorch et al., 1999; 2001). Furthermore, the Rsc3 and Rsc30 subunits of RSC belong to the Gal4-class of transcription factor-like proteins that recognize DNA motif preferentially found in promoter NDRs (Badis et al., 2008). Recent cryo-electron microscopy structural models of RSC bound to nucleosome revealed the modular organization of the RSC complex, structural details for its DNA and nucleosome recognition, as well as its role in NDR formation (Patel et al., 2019; Wagner et al., 2020; Ye et al., 2019). Sth1 is an essential catalytic subunit of RSC complex acting as ATP-dependent DNA translocase. Rsc8 subunit, essential for yeast viability, is present as a dimer and serves as a scaffold for the core structure of the RSC complex (Patel *et al.*, 2019). Importantly, a cooperation between human Mediator, TFIID and specifically PBAF complex—human homolog of RSC—was reported in reconstituted *in vitro* transcription system with chromatin template (Lemon et al., 2001). While the molecular mechanism of chromatin remodeling by RSC complex is well established, the functional cooperation between RSC and Mediator, to our knowledge, has not been investigated. Understanding of the mechanisms involved in this cooperation represents an important and timely question in chromatin-related fields relevant for severe human diseases.

In this work, we investigate the RSC/Mediator functional interplay *in vivo* on a genomic scale. We have found that Mediator physically interacts with RSC chromatin remodeling complex and colocalizes with this remodeler on wide NDRs within promoter/regulatory regions. We identified Mediator mutations that affect RSC/Mediator interaction and RSC binding to the chromatin, and are lethal in combination with RSC mutations. Moreover, these Mediator mutations impair nucleosome distribution on RSC/Mediator-associated NDRs leading to the presence of an additional nucleosome on these regions. We propose that Mediator contributes to RSC remodeling function for nucleosome depletion to form and maintain NDRs on promoter regions. This work thus reveals that Mediator and RSC cooperate through their physical interaction for nucleosomal organization and transcription.

Results

Physical interaction between Mediator and RSC complexes

We previously performed a two-hybrid screening for Mediator subunits with a yeast genomic library that allowed to characterize protein-protein interactions within the complex (Guglielmi et al., 2004). Additional interactions between Mediator subunits and other nuclear proteins were revealed and reported for Rad3 and Rad2 (Esnault et al., 2008; Eyboulet *et al.*, 2013). They also include interactions with RSC subunits that were not published. In particular, the Med17 Mediator head module subunit fused to the Gal4 DNA binding domain (G_{BD}) interacts in the two-hybrid assay with a Rsc8 RSC subunit fragment (amino acids 248-465) fused to the Gal4 activation domain (G_{AD}) (**Figure 1A**). We also showed that this interaction is maintained with the full-length Rsc8, as well as when Rsc8 was fused to G_{BD} and Med17 was fused to G_{AD} . In addition to the contact between Med17 and Rsc8, Med21 Mediator subunit fused to the G_{BD} interacts with Rsc3 fragment (amino acids 588-695) and weakly with Rsc30 fragment (amino acids 644-883) (**Supplementary Figure S1**). Further study was focused on the Med17-Rsc8

interaction. To identify the Med17 domain that is required for its interaction with Rsc8, we analyzed different N- and C-terminal Med17 truncation mutants for their interaction with Rsc8 full-length and Rsc8 fragment (**Figure 1B**). We conclude that Med17 domain (amino acids 346–687) is necessary and sufficient for Med17 interaction with Rsc8.

The contact between Mediator and RSC complexes was confirmed by coimmunoprecipitation (co-IP) experiments with crude extracts of a yeast strain expressing Rsc8-Myc from its native promoter (**Figure 1C**). Our results show that Mediator coimmunoprecipitates with Rsc8 in crude extracts. Indeed, the Med14 subunit of Mediator was detected by Western blotting when Rsc8-Myc was used to immunoprecipitate RSC complex.

Mediator and RSC colocalize on the promoter regions

To compare how Mediator and RSC are distributed on the yeast genome, we performed ChIP-seq experiments for Mediator (Med14 subunit), as well as RSC (Rsc8 and Sth1 subunits). Input DNA and DNA from ChIP with a non-tagged strain were used as negative controls. Yeast strains carrying C-terminal Myc-tagged version of Med14, Rsc8 and Sth1 were constructed and utilized in ChIP-seq experiments. In accordance with previous studies, heat map of tag density centered on transcription start sites (TSS) shows Mediator and RSC enrichment on promoter regions (**Figure 2A**). Specific examples of ChIP-seq profiles illustrate Mediator and RSC enrichment on promoter regions of Pol II-transcribed genes (**Supplementary Figure S2A**). Analysis of Mediator (Med14 subunit) and RSC (Rsc8 and Sth1 subunits) enrichment peaks on intergenic regions corresponding to upstream activating sequences (UAS) revealed that most of the Med14 peaks (242 out of 313) overlap with RSC peaks (**Figure 2B** and **Supplementary Figure S2B**). Heat maps of tag density generated for Mediator and RSC centered on Med14, Rsc8 and Sth1 enrichment peaks clearly illustrate Mediator colocalization with RSC (**Figure 2C** and **Supplementary Figure S2C**). Analysis on intergenic regions showed a strong

correlation between Rsc8 and Sth1 sets of data (Spearman's correlation coefficient (SCC) equal to 0.89), as expected for the subunits of the same remodeling complex, and moderate correlation between Rsc8/Sth1 and Mediator occupancies (SCC equal to 0.54 and 0.61, respectively) (**Supplementary Figure S2D**).

To further analyze RSC and Mediator enrichment peaks on intergenic regions, we compared their location with the nucleosome occupancy determined by MNase-seq. Heat maps of tag density generated by MNase-seq were centered on Med14, Rsc8 and Sth1 enrichment peaks, showing colocalization of RSC and Mediator peaks with nucleosome-depleted regions (NDR) (**Figure 2D**). The center of NDRs with minimum of nucleosome occupancy colocalizes with Med14, Rsc8 and Sth1 enrichment peaks. By comparing Mediator and RSC ChIP-seq profiles together with nucleosome distribution determined by MNase-seq in relation to TSS, we showed that Mediator and RSC are enriched on NDRs upstream of TSSs (**Figure 2E** and **Supplementary Figure S2E**). Taken together, our results show that Mediator and RSC colocalize on promoter regions of Pol II-transcribed genes that correspond to NDR.

RSC mutations affect nucleosome distribution and Mediator occupancy genome-wide

Since Mediator and RSC physically interact and share their binding location on promoter regions, we decided to take advantage of specific mutants in these two complexes to investigate their interrelationships for chromatin binding, nucleosomal organization and transcription. For RSC, we focused on the temperature-sensitive mutants in Rsc8 subunit that interacts with Mediator and Sth1 catalytic subunit of the complex. We analyzed the effect of *rsc8-ts* (G326D, I417F, K446M) and *sth1-ts* (P646L, F655L, D657G, N1077S, F1125L) mutations (Li et al., 2011) compared to the wild type (WT) strains after a shift to non-permissive temperature. Genome-wide nucleosome distribution was analyzed by MNase-seq and Pol II, Mediator (Med14-Myc tagged subunit) and RSC (Rsc8 or Sth1-Myc tagged subunits) distribution were

determined by ChIP-seq. Consistent with an essential role of this chromatin remodeling complex in nucleosome positioning and NDR formation on promoters and previously reported MNase-seq profiles in RSC-depleted cells (Kubik *et al.*, 2018), *rsc8* and *sth1* mutations led to global changes in nucleosome distribution with an upstream shift of nucleosomes on transcribed regions and a downstream shift of those on promoter regions (**Figure 3A**). This results in a significant decrease in the NDR length on promoter regions (**Figure 3B**). Focusing on RSC Sth1 enrichment peaks associated to NDR regions, heat maps of MNase-seq data illustrate major changes in *rsc8-ts* mutant compared to the WT strain (**Figure 3C**). In both mutants, a global effect on Pol II transcription was observed, as illustrated by a 3-fold decrease in Pol II ChIP-seq density on transcribed regions (**Supplementary Figure S3A**). Heat maps centered on Mediator or RSC peaks within intergenic regions as defined in the WT context show that *rsc8-ts* mutations affect both Mediator and RSC occupancy, leading to a decrease in the presence of Med14 and Sth1 on chromatin (**Figure 3D** and **Supplementary Figure S3B**). Our analysis of *sth1-ts* mutant reveals, on the contrary, a stabilization of Mediator on enrichment peaks of both complexes in this mutant compared to the WT and no major effect on Rsc8 occupancy (**Figure 3D** and **Supplementary Figure S3B**). ChIP followed by qPCR was also performed on selected regions (**Supplementary Figure S4**). Interestingly, these changes in Mediator occupancy in RSC mutants were accompanied by changes in physical interaction between Mediator and RSC. We observed a decrease in coimmunoprecipitation signal between Mediator and RSC complexes in *rsc8-ts* mutant and, on the contrary, an increase for *sth1-ts* mutant (**Figure 3E**). Taken together, our results show that RSC mutations affect global nucleosome organization and NDR formation on promoter regions. Moreover, we reveal their effect on Mediator occupancy associated with changes in physical interaction between RSC and Mediator.

Specific Mediator mutations affect NDR formation/maintenance

To further investigate relationships between Mediator and RSC, we focused on well-studied temperature-sensitive mutants in Med17 Mediator subunit (Eyboulet *et al.*, 2013; Eyboulet *et al.*, 2015; Georges *et al.*, 2019) that interacts with RSC. We combined *med17* mutations with *rsc8-ts* or *sth1-ts* RSC mutations and showed that *med17-140* (Q444P/M442L) was lethal in both RSC mutant contexts (**Figure 4A**). *med17-444* (Q444P) mutation did not lead to any synthetic phenotype in combination with *rsc8-ts* and showed a slower growth in *sth1-ts* context. Allele-specific lethality between Mediator and RSC mutations is consistent with the physiological importance of their interaction. Further analysis of physical interaction between Mediator and RSC, as well as genome-wide distribution of nucleosomes, Pol II, Mediator and RSC was focused on *med17-140* mutant compared to the WT strain. *med17-444* mutant was also included in the analysis for comparison. As previously described, both *med17-444* and *med17-140* mutations led to a strong transcriptional defect with a global decrease in Pol II occupancy compared to the WT (**Supplementary Figure S5A**).

We examined the effect of *med17* mutations on Mediator interaction with RSC by CoIP experiments. We found a slight but significant increase (P-value <0.05 in a Student t-test) in RSC/Mediator CoIP in crude extract from *med17-140* mutant compared to the WT and *med17-444* mutant (**Figure 4B**). This observation suggests that *med17-140* mutation modifies the physical interaction between Mediator and RSC.

We then investigated by ChIP-seq whether Mediator and RSC occupancies were affected in *med17* mutants. Our analysis of Mediator (Med14 subunit) and RSC (Rsc8 and Sth1 subunits) enrichment peaks on intergenic regions showed that the majority of the Med14 peaks overlap with RSC peaks in *med17-140* and *med17-444* mutants (372 out of 382 or 289 out of 307, respectively) (**Figure 4C** and **Supplementary Figure S5B**). Similar to the WT strain, Mediator and RSC colocalization was clearly observed in *med17* mutants (**Supplementary Figure S5C**).

A strong correlation between Rsc8 and Sth1 data sets was also maintained in both mutants (SCC equal to 0.93 and 0.90) (**Supplementary Figure S5D**). Correlation between Rsc8/Sth1 and Mediator occupancies observed in the WT was reduced in *med17-444* (SCC equal to 0.46 and 0.54, respectively) and even more in *med17-140* (SCC equal to 0.40 and 0.50, respectively) (**Supplementary Figure S5D**).

Our analysis revealed that *med17* mutations affect RSC occupancy. Heat maps centered on Mediator peaks on intergenic regions as defined in the WT context show that *med17-140* mutations lead to increased presence of Sth1 on the Mediator peaks (**Figure 4D** and **Supplementary Figure S5E**). In *med17-444* mutant, Rsc8 occupancy was increased (**Figure 4D** and **Supplementary Figure S5E**). For Mediator occupancy, no changes in distribution were observed in *med17-140* and only a slight increase was seen in *med17-444* mutants compared to the WT. ChIP followed by qPCR was also performed on selected regions for core promoters, UASs and gene bodies and confirmed our genome-wide analysis, illustrating effects of *med17* mutations on Pol II, Mediator and RSC occupancies (**Supplementary Figure S6**).

We then analyzed the nucleosome occupancy in *med17* mutants and observed a great effect of *med17-140* mutations on MNase-seq signal on promoter regions (**Figure 4E** and **Supplementary Figure S5F**). Metagene analysis and heat maps centered on RSC and Mediator enrichment peaks clearly show that NDR regions associated to these peaks were dramatically changed in *med17-140* compared to the WT and *med17-444* mutant. An additional peak was observed in *med17-140* mutant at the center of NDRs. To confirm that this increase in MNase-seq signal corresponds to nucleosome occupancy, we performed histone H3 ChIP analysis. We showed that H3 occupancy of UASs was increased by 2-fold in *med17-140* mutant compared to the WT and no changes were observed in *med17-444* mutant (**Figure 4F** and **Supplementary Figure S7A**). This effect was specific to UASs and was not observed for other tested regions including core promoters and gene bodies. Examples of MNase-seq profiles around selected

UASs clearly illustrate a specific increase in nucleosome occupancy of these regions in *med17-140* mutant compared to the WT and *med17-444* mutant (**Supplementary Figure S7B**). Taken together, our results suggest that Mediator is involved in the maintenance of NDRs associated to RSC and itself.

Specific Mediator mutations affect the maintenance of wide NDRs bound by Mediator and RSC

To further investigate the Mediator effect on NDR maintenance, we classified Mediator and RSC enrichment peaks in two categories: peaks shared between the two complexes and unique peaks enriched only by RSC. Metagene analysis and heat maps in *med17-140* show the most important increase in nucleosome occupancy on NDRs associated to shared Mediator/RSC peaks compared to unique peaks (**Figure 5A** and **Supplementary Figure S8A**). We then performed metagene analysis of rescaled tag density centered on TSS that revealed the most pronounced changes in MNase-seq profiles on NDR upstream of TSS associated with shared Mediator/RSC peaks (**Figure 5B** and **Supplementary Figure S8B**). In addition, the MNase-seq signal at +1 nucleosome position was reduced in *med17-140* mutant in comparison with +2 and +3 nucleosomes, suggesting that Mediator mutations lead to filling of NDR and destabilization of the TSS-associated +1 nucleosome. We also noticed that shared Mediator/RSC peaks are characterized by a higher RSC occupancy compared to the unique RSC peaks and a higher Sth1 stabilization in *med17-140* mutant with respect to the WT (**Figure 5C, D** and **Supplementary Figure S8C, D**). Rsc8 occupancy decreased in *med17-140* mutant compared to the WT, while Mediator occupancy remained close to the WT level (**Supplementary Figure S8C, D**).

We then compared the length of NDRs associated with shared Mediator/RSC peaks and unique RSC peaks (**Figure 5E** and **Supplementary Figure S8E, F**). Our analysis showed that shared

Mediator/RSC peaks are associated with wider NDRs (mean size equal to 427 bp in comparison with 314 for unique peaks) and larger range of NDR sizes (**Figure 5E** and **Supplementary Figure S8E, F**). When nucleosome occupancy data for the WT and *med17* mutants were visualized by ordering promoter-associated NDRs by their length for all Pol II-transcribed genes, a clear increase in nucleosome occupancy was observed in *med17-140* for wider NDRs as defined in the WT (**Figure 5F**).

As described above, Pol II transcription was globally affected in *med17-140* mutant (**Supplementary Figure S5A**). Our Pol II ChIP-seq analysis showed that genes associated with shared RSC/Mediator peaks correspond to higher transcription level compared to genes associated with unique RSC peaks (**Supplementary Figure S9**). A decrease in transcriptional level in *med17-140* mutant was comparable for both groups of genes.

Taken together, our results demonstrate that Mediator mutations affecting RSC/Mediator interaction and RSC binding to the chromatin, lead to a substantial change in nucleosome occupancy on wide NDRs associated with RSC and Mediator. This suggests that Mediator is involved in RSC-dependent NDR formation or maintenance on promoter/regulatory regions.

Discussion

In this study, we addressed the key question on the functional interplay between two essential coregulator complexes acting in transcription and chromatin organization, Mediator and RSC chromatin remodeler. **Figure 6** illustrates, based on our findings, how interrelationships between these two complexes contribute to nucleosome organization on promoter regions through NDR formation or maintenance. Our four main outcomes can be summarized as follows. (i) We show that Mediator and RSC physically interact and identify specific subunits of these complexes, in particular Med17 and Rsc8, that are in contact. (ii) Furthermore, Mediator and RSC co-localize on intergenic regions, with RSC being enriched on Mediator

peaks and vice-versa. We then show that Mediator and RSC are enriched on NDRs upstream the TSS and that shared RSC/Mediator peaks are associated with wide NDRs. (iii) Taking advantage of yeast genetics, our study shows that mutations in RSC complex affect chromatin occupancy of Mediator and vice-versa. Consistent with a functional link between the two coregulators, specific Mediator and RSC mutations are co-lethal. (iv) Mediator mutations (*med17-140*) that affect RSC/Mediator interaction and RSC binding to the chromatin lead to a great change in nucleosome occupancy on RSC/Mediator-associated NDRs and the presence of an additional nucleosome on these regions. Moreover, the +1 nucleosome occupancy was reduced in this mutant, suggesting that Mediator mutations lead to destabilization of the TSS-associated +1 nucleosome. Taken together, our results reveal that Mediator and RSC cooperate through their physical interaction for nucleosomal organization and transcription. We propose that Mediator is involved in RSC-dependent NDR formation or/and maintenance on promoter/regulatory regions by contributing to RSC remodeling function for nucleosome eviction within NDRs and stable positioning of +1 nucleosome.

To our knowledge, this work provides the first evidence that Mediator contributes to nucleosome distribution and NDR formation or/and maintenance on promoter/regulatory regions in cooperation with RSC complex. The effect of Mediator mutations on nucleosome occupancy could not be explained by a global decrease in transcription *per se* since it was observed only for *med17-140* but not for *med17-444* with a similar decrease in Pol II occupancy. Moreover, it was previously shown that a decrease of transcription in *rpb1-1* Pol II mutant did not lead to any differences in nucleosome distribution (Hartley and Madhani, 2009). Mechanisms of chromatin remodeling activity of RSC to form wide NDRs were investigated in several studies (Brahma and Henikoff, 2019; Hartley and Madhani, 2009; Kubik et al., 2015; Kubik *et al.*, 2018). Moreover, a recent thermodynamic model shows that RSC is the most significant contributor of NDR, allowing to predict the correct size for the large proportion of

NDRs (Kharerin and Bai, 2021). Indeed, RSC was shown to be required for the normal positioning of NDR-flanking nucleosomes on the majority of promoter regions (Hartley and Madhani, 2009; Krietenstein *et al.*, 2016; Kubik *et al.*, 2015). An additional participation of Abf1 and Reb1 general regulatory factors (GRFs) on a subset of promoter regions was reported (Hartley and Madhani, 2009; Kubik *et al.*, 2015), even though the exact relationships between RSC and GRF actions on the chromatin architecture of promoter regions remain unclear. To explain the properties of nucleosomes at promoter NDRs, it has been proposed that unstable or “fragile” nucleosomes are present at promoter regions of 40% of Pol II-transcribed genes corresponding to near 2000 genes (Kubik *et al.*, 2015). More recently, RSC was shown to bind to nucleosomes at wide NDRs and proposed to mobilize and destabilize them (Brahma and Henikoff, 2019). Based on these results, fragile nucleosomes were suggested to be transient intermediates of RSC remodeling (Brahma and Henikoff, 2019). We propose that Mediator contributes to RSC-dependent remodeling mechanisms at promoter regions.

Our results suggest that an increase in physical interaction between Mediator and RSC, and a stabilization of Sth1 RSC subunit on wide NDRs can affect RSC function in nucleosome eviction on these regions, without major effect on positioning of nucleosomes +2 and +3. Interestingly, *in vitro* study revealed that an enhanced RSC-nucleosome interaction due to histone acetylation by SAGA has an inhibitory role on RSC function in nucleosome eviction, without affecting all RSC activities (Lorch *et al.*, 2018). This means that an enhancement in RSC interactions with its partners such as nucleosomes can locally impact some of the RSC remodeling activities.

It was previously hypothesized that the function of RSC in nucleosome eviction at promoter regions can differ from its function in +1 and -1 nucleosome positioning or that RSC bound to a nucleosome can transit between +1 and -1 nucleosome positions, with RSC-associated particle at NDR being a transient intermediate (Brahma and Henikoff, 2019). Remarkably, recent

studies using single-molecule imaging reveal that RSC, together with other chromatin remodelers, frequently undergoes short-lived chromatin interactions and suggest a dynamic competition between PIC assembly and the +1 nucleosome (Kim et al., 2021; Nguyen et al., 2021). In any case, it is strongly assumed that the NDR formation/maintenance and positioning of flanking +1 and -1 nucleosomes should be closely related. In this work we show that Mediator *med17-140* mutations lead to filling of wide RSC/Mediator-associated NDRs by precluding nucleosome eviction and to destabilization of the TSS-associated +1 nucleosome. It is well established that RSC together with other chromatin remodelers participates in positioning of +1 nucleosome (Krietenstein *et al.*, 2016; Kubik *et al.*, 2018). Interestingly, *in vitro* study demonstrated that enhanced RSC-histone interaction stabilizes +1 nucleosome by preventing its removal by RSC (Lorch *et al.*, 2018). The +1 nucleosomes are characterized by high turnover (Dion et al., 2007); they are asymmetric, partially unwrapped and associated to RSC (Ramachandran et al., 2015). We propose that Mediator mutations can affect RSC activities leading to destabilization of +1 nucleosome through impaired nucleosome turnover or its less defined-positioning. Importantly, these nucleosomes have a key role for PIC assembly and transcription initiation since they are associated with TSS. PIC and nucleosomes can be assembled in competitive or cooperative manner depending on the promoters (Rhee and Pugh, 2012). It is well established that Mediator is essential in PIC assembly and we previously suggested that this role is related to chromatin architecture in terms of nucleosome occupancy and dynamics (Eychenne et al., 2016; Soutourina, 2018).

RSC is also known for its role in 3D chromatin organization. This complex is enriched on strong boundaries between chromosomal interacting domains (CIDs), and mutations in RSC subunits affect the folding of the yeast genome (Hsieh et al., 2015). Mediator is also enriched on strong boundaries of CIDs and a deletion of Mediator Med1 subunit modifies chromatin compaction (Chereji et al., 2017; Hsieh *et al.*, 2015). Consistent with physical interactions between

Mediator and RSC complexes, mass spectrometry analysis of coimmunoprecipitated proteins showed that chromatin-bound Mediator is associated with RSC subunits (Chereji *et al.*, 2017). Future studies will help to understand how the Mediator link to RSC can have an impact on higher-order genome organization.

Previously, we showed that RSC interacts with RNA polymerases and that the loss of this interaction alters the promoter chromatin structure of several RSC-regulated genes, leading to impaired transcription (Soutourina *et al.*, 2006). These results have led us to propose that RSC might act as a coactivator independently of its catalytic activity in chromatin remodeling. Further studies will be needed to understand the exact relationships between chromatin remodeling activity of RSC and its effect on transcription independent of its catalytic activity. In the light of Mediator and SWI-SNF remodelers PBAF/BAF/ncBAF conservation from yeast to humans, the functional cooperation between these complexes is likely to exist in all eukaryotes. The conservation of Mediator connection to chromatin remodelers might give insights into our understanding of human diseases such as many cancers involving Mediator and PBAF/BAF/ncBAF subunits.

Acknowledgements

We thank Charles Boone, Jenny Wu, Claes Gustafsson and Vincent Geli for strains, the High-throughput sequencing facility of I2BC for its sequencing and bioinformatics expertise, the SPI (CEA/Saclay) for monoclonal antibodies, Matthieu Gérard, Pascale Lesage and Adriana Alberti for fruitful discussions. This work was supported by Fondation ARC [PGA1 RF20170205342]; Comité Ile-de-France - La Ligue Nationale Contre le Cancer. K.A. was supported by a PhD training contact from the French Ministry of Higher Education and Research. L.Z. was supported by a PhD training contract from the CEA NUMERICS program, which has received

funding from European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 800945.

Author contributions

JS and MW designed the experiments. KA, NGA and VMF performed the experiments. KA and LZ performed data analysis with supervision of CDW and AG. Supervision and project coordination was done by JS. JS and KA wrote the original draft. Review and editing were done by JS, KA, CDW, AG, MW and LZ.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

Figure Legends

Figure 1. Mediator and RSC physically interact. (A) Gal4 DNA-binding domain (G_{BD}), alone or in fusion with full length Med17, Med22, Rsc8 or Rsc8 fragment (Rsc8F: amino acids 248-465), was co-expressed with Gal4 activation domain (G_{AD}) alone or in fusion with Rsc8, Rsc8 fragment, Med17 or Med22. Interaction between Med17 and Med22 subunits of Mediator was included as a positive control. Yeast cells were spotted on SD+2A medium supplemented with 10 mM 3-AT, grown for 3 days (left panel) and then stained with X-Gal for 24h (right panel). (B) Gal4 DNA-binding domain (G_{BD}), alone or in fusion with either full length Med17 or truncations of Med17 (termed Med17 fragments (F) 1 to 6), was co-expressed with Gal4 activation domain (G_{AD}) alone or in fusion with full-length Rsc8 or Rsc8 fragment (Rsc8F). Yeast cells were spotted on SD+2A medium supplemented with 25 mM 3-AT, grown for 3 days (left panel) and then stained with X-Gal for 24h (right panel). The boundaries of the Med17 fragments in amino acids are represented on the right. (C) Western blot analysis of Mediator-

RSC interaction. Crude extracts were prepared from yeast WT strain expressing a tagged version of Rsc8 (Myc) following a 45-min shift at 37°C, after reaching exponential phase at 30°C. A strain carrying non-tagged Rsc8 was used as a negative control. Samples were immunoprecipitated with anti-Myc antibodies. Immunoprecipitated proteins and inputs were analyzed by western blotting with anti-Myc and anti-Med14 antibodies (n=3). See also Figure S1.

Figure 2. Mediator and RSC colocalize on NDRs within promoter regions. (A) Heat maps and average profiles of Sth1-Myc, Rsc8-Myc and Med14-Myc ChIP-seq signals centered on TSSs (-500 bp to +500 bp). Negative control was obtained from a Myc IP in a non-tagged strain (NT). Signals are expressed as the normalized read counts. (B) Venn diagram illustrating the number of Mediator (Med14) peaks that overlap or not with RSC peaks, which are defined as overlapping peaks between Sth1 and Rsc8 plus the unique ones for each protein. (C) Heat maps and average profiles of Med14-Myc, Sth1-Myc and Rsc8-Myc centered on Med14 peaks within intergenic regions (-500 bp to +500 bp). Signals are expressed as the normalized read counts. (D) Heatmaps and average profiles of MNase-digested DNA centered on Sth1, Rsc8 or Med17 peaks within intergenic regions (-500 bp to +500 bp). The number of peaks for each protein is indicated in brackets. Signals are expressed as the normalized read counts. (E) Sth1, Rsc8, Med14 and MNase profiles centered on TSSs associated to Med14 peaks (-500 bp to +500 bp). The four profiles were normalized for comparison by rescaling their maximum values to 1. See also Figure S2.

Figure 3. RSC mutations impair the NDR architecture and the Mediator-RSC interaction. (A) Average MNase profiles centered on TSSs (n=5337, -500 bp to +500 bp), in WT, *rsc8-ts* and *sth1-ts* strains. The profiles were normalized for comparison by rescaling their maximum

values to 1. **(B)** Boxplot showing the range of NDR lengths in WT, *rsc8-ts* and *sth1-ts* strains. The three asterisks represent a significant difference between the WT and the mutant at P-value < 0.001 in a Wilcoxon test. **(C)** Heat maps and average MNase profiles centered on Sth1 peaks within intergenic regions (n=763, -500 bp to +500 bp). Signals are expressed as the normalized read counts. **(D)** Left panel: Heat maps and average profiles of Med14-Myc and Sth1-Myc ChIP-seq signals in WT or *rsc8-ts* centered on Med14 WT peaks (n=187, -500 bp to +500 bp). Right panel: Heat maps and average profiles of Med14-Myc and Rsc8-Myc ChIP-seq signals in WT or *sth1-ts* centered on Med14 WT peaks (n=209, -500 bp to +500 bp). Negative control was obtained from a Myc IP in a non-tagged strain (NT). Signals are expressed as the normalized read counts. **(E)** Western blot analysis of Mediator-RSC interaction. Crude extracts were prepared from yeasts expressing tagged versions of Sth1 or Rsc8 (Myc) in the WT or mutant strains (*rsc8-ts* in the left panel and *sth1-ts* in the right panel, respectively) following a 6-hour or 2.5-hour shift at 37°C (for *rsc8-ts* and *sth1-ts*, respectively), after reaching exponential phase at 30°C. Samples were immunoprecipitated with anti-Myc antibodies. Immunoprecipitated proteins and inputs were analyzed by western blotting with anti-Myc and anti-Med14 antibodies. The intensity of immune staining for the coimmunoprecipitated Med14 signals was normalized against the immunoprecipitation and input signals (bottom panels). The mean values and standard deviations (indicated by error bars) of at least three independent experiments are shown. The asterisk represents a significant difference between the WT and the mutant at P-value < 0.05 in a Student t-test. See also Figures S3, S4.

Figure 4. Mediator-RSC interaction and NDRs are disturbed in *med17-140*. **(A)** Synthetic phenotypes between *rsc* and *med17* mutations. RSC mutants (*sth1-ts* and *rsc8-ts*) have the deletion of *MED17* gene, complemented with a plasmid containing WT *MED17:URA3*. *rsc* mutants were transformed by plasmids containing either WT or mutant (*med17-140*, *med17-*

444) versions of Med17. The MED17 WT copy (*MED17:URA3*) was counterselected by spotting the strains on 5-FOA medium. **(B)** Western blot analysis of Mediator-RSC interaction. Crude extracts were prepared from yeast cells expressing tagged versions of Rsc8 (Myc) in the WT or mutant strains (*med17-140* and *med17-444*) following a 45-min shift at 37°C, after reaching exponential phase at 30°C. Samples were immunoprecipitated with anti-Myc antibodies. Immunoprecipitated proteins and inputs were analyzed by western blotting with anti-Myc and anti-Med14 antibodies. The intensity of immune staining for the coimmunoprecipitated Med14 signals was normalized against the immunoprecipitation and input signals. The mean values and standard deviations (indicated by error bars) of three independent experiments are shown. The asterisk represents a significant difference between the WT and the mutant at P-value <0.05 in a Student t-test. **(C)** Venn diagrams illustrating the number of Med14 peaks that overlap or not with RSC peaks in *med17-140* (left panel) and *med17-444* (right panel). RSC peaks are defined as Sth1 and Rsc8 overlapping peaks plus the ones that are specific for each protein. **(D)** Heat maps and average profiles of Sth1 (top), Rsc8 (middle) and Med14 (bottom) ChIP-seq signals centered on Med14 WT peaks within intergenic regions (n=313, -500 bp to +500 bp). Negative control was obtained from a Myc IP in a non-tagged strain (NT). Signals are expressed as the normalized read counts. **(E)** Heat maps and average MNase profiles centered on Sth1 peaks within intergenic regions (n=472, -500 bp to +500 bp) in the WT, *med17-140* (left panel) and *med17-444* (right panel) strains. Signals are expressed as the normalized read counts. **(F)** Ratios of mutant/WT H3 occupancy for *med17-140* (dark gray) and *med17-444* (light gray) on both upstream activating sequences (UAS) and coding regions (CR). Average ratios were calculated from quantitative PCR data (see **Supplementary Figure S7**) observed on three UASs and three CRs. See also Figures S5-7.

Figure 5. NDRs are disturbed in *med17-140* on promoter regions enriched by Mediator and RSC. (A) Heat maps and average MNase profiles centered on *med17-140* Sth1 peaks that overlap (left panel) or not (right panel) with Med14 peaks (n=344 and 818, respectively, -500 bp to +500 bp) within intergenic regions in the WT and *med17-140* strains. Signals are expressed as the normalized read counts. (B) Average MNase profiles centered on TSSs associated to Sth1/Med14-shared peaks (n=344) or unique Sth1 peaks (n=818), from -500 bp to +500 bp, in WT and *med17-140*. The profiles were normalized for comparison by rescaling their maximum values to 1. NDR: nucleosome-depleted region. +1: nucleosome +1. (C) Sth1, Rsc8 and Med14 profiles centered on TSSs associated to shared Med14/Sth1 peaks (left panel, n=344) or unique Sth1 peaks (right panel, n=818), -500 bp to +500 bp. (D) Boxplots showing the Sth1 enrichments in WT and *med17-140* on *med17-140* Sth1 peaks that overlap (termed shared) or not (termed unique) with Med14 peaks. The three asterisks represent a significant difference between the WT and the mutant at P-value < 0.001 in a Wilcoxon test. (E) Boxplots showing the NDR lengths on promoters associated to both Sth1 and Med14 (middle) or Sth1 only (right). The three asterisks represent a significant difference between the Sth1/Med14-associated NDRs and all NDRs or Sth1-associated NDRs at P-value < 0.001 in a Wilcoxon test. (F) Heat maps and average MNase profiles centered on TSSs (n=5337, -1000 bp to +300 bp) in the WT, *med17-140* and *med17-444* strains. TSS regions were sorted according to the size of the associated NDR. Signals are expressed as the normalized read counts. See also Figures S8, S9.

Figure 6. Mediator regulates RSC function in NDR formation/maintenance.

In the WT context (upper panel), RSC and Mediator physically interact and colocalize on promoter/regulatory regions. Their cooperation contributes to RSC function in nucleosome eviction for wide NDR formation and stable positioning of TSS-associated +1 nucleosomes.

In *med17-140* Mediator mutant (lower panel), physical interaction between RSC and Mediator is increased and Sth1 RSC subunit is stabilized on promoter/regulatory regions that disturb RSC remodeling activities. As a consequence, nucleosomes within NDRs are not evicted and +1 nucleosomes are destabilized. We propose that Mediator is involved in RSC-dependent NDR formation/maintenance on promoter/regulatory regions.

Materials and Methods

Strains

All *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study can be found in **Supplementary Table S1**.

med17 mutant strains were previously described (Eyboulet *et al.*, 2013; Eyboulet *et al.*, 2015). *rsc8* and *sth1* mutant strains were obtained from Charles Boone (Li *et al.*, 2011). *rsc8* and *sth1* mutations associated with *KanMX* cassette were then transferred to YPH499 background by the standard one-step methods. Med14-Myc, Rsc8-Myc, Sth1-Myc strains carrying C-terminal Myc-tagged version of Med14, Rsc8 and Sth1 subunits were constructed by inserting Myc epitopes followed by either *KanMX*, *His3MX6* or *LEU2* markers using the standard one-step methods. Prior to ChIP-qPCR, ChIP-seq, MNase-seq and CoIP experiments, Mediator mutant strains were shifted for 45 min at 37°C, *rsc8-ts* strains were shifted for 6h at 37°C, and *sth1-ts* strains were shifted for 2h30 at 37°C. Spotting assays were done as previously described (Georges *et al.*, 2019).

Yeast two-hybrid assay

Haploid strains (Y187 and Y190) were transformed with constructs expressing the desired gene fusion with Gal4 DNA-binding domain (*TRP* auxotrophic marker) or Gal4 activating domain (*LEU* auxotrophic marker). Clones growing on *-trp* or *-leu* medium were selected and the presence of the plasmid was verified by PCR.

Haploid strains growing on *-trp* and *-leu* agar plates were scraped and resuspended in sterile water. The strains were then mated together by spotting 2.5 µl of each suspension on a YPD plate and incubating overnight at 30°C. Patches were replica-plated on *-trp -leu* plates and incubated for 3 days at 30°C. Diploid strains were scraped and resuspended in synthetic defined (SD) medium supplemented with 40 mg/l Adenine (SD+2A). Optical density at 600 nm

of the suspension was measured and the latter was diluted to obtain an OD₆₀₀ of 0.1. 10 µl of this dilution were then spotted on agar plates containing SD+2A medium supplemented with 10, 25 or 50 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3AT), and incubated for 3 days at 30°C.

When indicated, X-gal staining was done as follows: for one 120 mm square petri dish, 10 ml 1% Agarose in water was mixed with 10 ml phosphate buffer (made from 6.15 ml 1M K₂HPO₄ and 3.85 ml 1M KH₂PO₄ aqueous solutions), both prewarmed at 50°C. 1.2 ml N,N-dimethylformamide (DMF), 0.2 ml 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) solution (in ddH₂O) and 0.2 ml of 4% X-Gal solution (in DMF, kept at -20°C) were successively added to the mix. The mix was then poured onto yeast spots. As soon as solidified, the plate was incubated at 30°C for 24h. Pictures were taken using an office scanner.

Coimmunoprecipitation

A total of 100 ml exponentially growing cells were collected by centrifugation, washed and cell lysis was performed by bead-beating for 30 min at 4°C in lysis buffer (20% Glycerol, 50 mM Hepes-KOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.05% NP-40, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Complete protease inhibitor cocktail (Roche)) as described previously (Soutourina *et al.*, 2006). Protein concentration was measured using Bradford method, taking bovine serum albumin (BSA) as reference.

Protein extracts were used for immunoprecipitation as follows: 50 µl Dynabeads pan-mouse IgG were washed three times in cold phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% BSA, and incubated 30 min at 4°C on rotary wheel in the same solution. The beads were then incubated 1 h with the anti-Myc antibody (9E10) at 4°C (Eppendorf ThermoMixer, 1,300 rpm), washed three times in PBS/0.1 % BSA and two times in lysis buffer. A total of 1.5 mg of proteins were added to beads and lysis buffer was added to have the same final volume in all

samples (at least 50 μ l). Beads and proteins were incubated for 3 hours at 4°C (Eppendorf ThermoMixer, 1,300 rpm). Beads were then washed four times with lysis buffer and recovered in 40 μ l of laemmli buffer (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 0.5 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 % Glycerol, 1.25 % β -mercaptoethanol, 0.0125 % Bromophenol blue). Proteins were eluted at 95°C for 10 min and stored at -80°C.

Prior to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, samples were incubated at 85°C for 5 minutes. Separation was done on 8% bis-acrylamide gels in Tris-Glycine-SDS buffer and proteins were transferred on Amersham Protran 0.2 μ m NC membranes (GE Healthcare) for western blotting. Membranes were bathed in PBS supplemented with 0.05% Tween 80 (PBS-T) with 5% Milk for 1 h at room temperature, then incubated overnight at 4°C with either anti-Myc (9E10) or anti-Med14 (Eyboulet *et al.*, 2015) antibodies. After three washes in PBS-T with 2% Milk the membranes were incubated with secondary antibodies (HRP-anti Rabbit/Mouse-IgG (H+L), Promega) for 1 hour at room temperature in PBS-T. After three more washes in PBS-T, detection was carried out using Amersham ECL-Prime reagents (GE Healthcare). Imaging was done using a Fusion FX7 imaging system.

The relative intensity of immune staining was quantified using ImageJ software. The intensity of immune staining for coimmunoprecipitated protein signals relative to the WT was normalized against immunoprecipitation and input signals. The mean values and standard deviation (indicated by error bars) of three independent experiments were calculated.

Chromatin immunoprecipitation

Cells were grown exponentially to 0.6 OD₆₀₀ and cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min. Cells were lysed by bead-beating in FA/SDS buffer (50 mM Hepes-KOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with PMSF for 30 min at 4°C. Chromatin was recovered after a centrifuge step (13,400 rcf, 20

min, 4°C) and was subjected to sonication on a S220 focused-ultrasonicator (Covaris) (180s ON – 30s OFF – 180s ON, 150W pulses, duty factor 10). Sonicated chromatin was recovered after centrifuge (9,300 rcf, 30 min, 4°C) and stored at -80°C. The sizes of the DNA fragments were checked by migrating the samples on agarose.

Immunoprecipitation, DNA purification and library preparation were done on IP-Star® Compact Automated System (Diagenode Cat# B03000002).

IP was done as previously described (Georges *et al.*, 2019). Anti-Myc (9E10), anti-Pol II (8WG16) and anti-H3 (Merck, 07-690) antibodies were used. Spike-in *S. pombe* chromatin was added to the different samples at the IP step (**Supplementary Table S2**). Crosslink reversion, RNase treatment and DNA purification were done as previously described (Georges *et al.*, 2019), except for the RNase treatment duration which was 1h for this current study.

qPCR and libraries preparations were done as previously described (Georges *et al.*, 2019). qPCR primers can be found in **Supplementary Table S3**.

MNase treatment

Cells were grown exponentially to 0.6 OD600 and cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min. They were then washed with ST buffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 100 mM NaCl) and frozen. Cells were lysed by bead-beating in FA lysis buffer (50 mM Hepes-KOH pH 8, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1% Triton, 0.1% sodium deoxycholate) supplemented with PMSF for 30 minutes at 4°C. Chromatin was recovered after a centrifuge step (16,000 rcf, 10 min, 4°C) in MNase buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.34 M sucrose, 15 mM KCl, 60 mM NaCl, 3 mM CaCl₂) and was subjected to mild MNase (NEB, M0247S) treatment (20 min, 37°C on thermomixer). Reaction was stopped by addition of 10 mM EDTA on ice. Digested chromatin was recovered after centrifugation (16,000 rcf, 10 min, 4°C), and the remaining pellet was mildly sonicated (20" ON + 40" OFF, 4 cycles, mild), after a centrifugation step under similar

conditions the chromatin samples were recovered at -80°C. DNA was extracted with PCR purification kit (Qiagen). The sizes of the DNA fragments were checked by migrating the samples on both hand-made agarose and BioAnalyzer (Agilent) after pronase treatment. MNase digestion profiles were comparable between different samples and contained a major mono-nucleosome peak with clearly visible di- and tri-nucleosome peaks.

Library preparations were done as previously described (Georges *et al.*, 2019), except for the sizing step that was hand-made following the AMPure protocol (Beckman) to remove the free sequencing primers only. Library profiles were checked by migrating them on BioAnalyzer (Agilent).

Sequencing data analysis

Sequencing data were analyzed using the following procedure. Reads were first trimmed with cutadapt (v1.12, <http://dx.doi.org/10.14806/ej.17.1.200>), then mapped on a *S. cerevisiae* + *S. pombe* concatenated genome (University of California at Santa Cruz [UCSC] versions sacCer3 and ASM284v2, respectively) using bowtie2 (v2.3.4.3, doi: 10.1038/nmeth.1923). Files were converted using samtools (v1.9, doi: 10.1093/bioinformatics/btp352) and deeptools (v3.5.0, doi: 10.1093/nar/gkw257). After bam conversion, *S. cerevisiae* alignments were separated from *S. pombe* alignments and the spike-in normalization factors were determined. Read count were then normalized in reads per million of mapped reads (RPM) and spike-in normalization factors. MNase-seq experiments were only normalized in RPM. The number of mapped reads for each sequencing experiment and normalization coefficients are indicated in **Supplementary Table S4**. For MNase-seq experiments, the option --MNase of bamCoverage was used so that only the mononucleosome fragments were kept (fragments shorter than 130 bp and longer than 200 bp were removed from analysis). Input DNA and DNA from ChIP with a non-tagged strain were used as negative controls.

The transcribed regions were determined using the TSS and TES (transcription end sites) of mRNA genes taken from (Malabat et al., 2015; Pelechano et al., 2013) (n=5337). The lengths of the nucleosome-depleted regions of promoters were calculated from the WT MNase-seq data as the distance between the -1 and +1 nucleosomes, which were defined as the closer nucleosomes upstream and downstream from the TSS, respectively (<https://doi.org/10.5281/zenodo.6669875>). Peak calling was done on Med17, Rsc8 and Sth1 experiments using MACS2 (v2.2.7.1). The peaks were filtered (fold-change >2.5 and *P*-value < 1e-10), and as we wanted to focus on protein-coding gene promoters, we kept those that were found on intergenic regions associated to protein-coding genes and <1 kb away from TSSs. We excluded intergenic regions related to replication origins, centromeres, long-terminal repeats, Pol III and Pol I-transcribed genes, retrotransposons, small nucleolar RNAs, small nuclear RNAs and telomeres. For some analysis, peaks were sorted using bedtools (v2.30.0) to define those that overlap (shared) or not (unique) between two data sets. All correlations were calculated with Spearman method (Hollander, 1973). All figures were prepared using R packages (v3.5.1, <https://www.R-project.org/>). Specifically, heatmap with sorted nucleosome-depleted regions was done with R using the package ComplexHeatmap.

Data availability

The ChIP-seq and MNase-seq data generated in this study have been submitted to ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) under the accession number E-MTAB-12198.

References

- Badis, G., Chan, E.T., van Bakel, H., Pena-Castillo, L., Tillo, D., Tsui, K., Carlson, C.D., Gossett, A.J., Hasinoff, M.J., Warren, C.L., et al. (2008). A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Mol Cell* 32, 878-887. 10.1016/j.molcel.2008.11.020.
- Brahma, S., and Henikoff, S. (2019). RSC-Associated Subnucleosomes Define MNase-Sensitive Promoters in Yeast. *Mol Cell* 73, 238-249 e233. 10.1016/j.molcel.2018.10.046.
- Chereji, R.V., Bharatula, V., Elfving, N., Blomberg, J., Larsson, M., Morozov, A.V., Broach, J.R., and Bjorklund, S. (2017). Mediator binds to boundaries of chromosomal interaction domains and to proteins involved in DNA looping, RNA metabolism, chromatin remodeling, and actin assembly. *Nucleic Acids Res* 45, 8806-8821. 10.1093/nar/gkx491.
- Clapier, C.R., Iwasa, J., Cairns, B.R., and Peterson, C.L. (2017). Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 407-422. 10.1038/nrm.2017.26.
- Clapier, C.R., Kasten, M.M., Parnell, T.J., Viswanathan, R., Szerlong, H., Sirinakis, G., Zhang, Y., and Cairns, B.R. (2016). Regulation of DNA Translocation Efficiency within the Chromatin Remodeler RSC/Sth1 Potentiates Nucleosome Sliding and Ejection. *Mol Cell* 62, 453-461. 10.1016/j.molcel.2016.03.032.
- Dion, M.F., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Friedman, N., and Rando, O.J. (2007). Dynamics of replication-independent histone turnover in budding yeast. *Science* 315, 1405-1408. 10.1126/science.1134053.
- Esnault, C., Ghavi-Helm, Y., Brun, S., Soutourina, J., Van Berkum, N., Boschiero, C., Holstege, F., and Werner, M. (2008). Mediator-dependent recruitment of TFIIH modules in preinitiation complex. *Mol Cell* 31, 337-346. 10.1016/j.molcel.2008.06.021.
- Eyboulet, F., Cibot, C., Eychenne, T., Neil, H., Alibert, O., Werner, M., and Soutourina, J. (2013). Mediator links transcription and DNA repair by facilitating Rad2/XPG recruitment. *Genes Dev* 27, 2549-2562. 10.1101/gad.225813.113.
- Eyboulet, F., Wydau-Dematteis, S., Eychenne, T., Alibert, O., Neil, H., Boschiero, C., Nevers, M.C., Volland, H., Cornu, D., Redeker, V., et al. (2015). Mediator independently orchestrates multiple steps of preinitiation complex assembly in vivo. *Nucleic Acids Res* 43, 9214-9231. 10.1093/nar/gkv782.
- Eychenne, T., Novikova, E., Barrault, M.B., Alibert, O., Boschiero, C., Peixeiro, N., Cornu, D., Redeker, V., Kuras, L., Nicolas, P., et al. (2016). Functional interplay between Mediator and TFIIIB in preinitiation complex assembly in relation to promoter architecture. *Genes Dev* 30, 2119-2132. 10.1101/gad.285775.116.
- Georges, A., Gopaul, D., Denby Wilkes, C., Giordanengo Aiach, N., Novikova, E., Barrault, M.B., Alibert, O., and Soutourina, J. (2019). Functional interplay between Mediator and RNA polymerase II in Rad2/XPG loading to the chromatin. *Nucleic Acids Res* 47, 8988-9004. 10.1093/nar/gkz598.
- Guglielmi, B., van Berkum, N.L., Klapholz, B., Bijma, T., Boube, M., Boschiero, C., Bourbon, H.M., Holstege, F.C., and Werner, M. (2004). A high resolution protein interaction map of the yeast Mediator complex. *Nucleic Acids Res* 32, 5379-5391. 10.1093/nar/gkh878.
- Hartley, P.D., and Madhani, H.D. (2009). Mechanisms that specify promoter nucleosome location and identity. *Cell* 137, 445-458. 10.1016/j.cell.2009.02.043.
- Hollander, M.W., D.A. (1973). *Nonparametric Statistical Methods* (New York: John Wiley & Sons).

- Hsieh, T.H., Weiner, A., Lajoie, B., Dekker, J., Friedman, N., and Rando, O.J. (2015). Mapping Nucleosome Resolution Chromosome Folding in Yeast by Micro-C. *Cell* *162*, 108-119. 10.1016/j.cell.2015.05.048.
- Kharrerin, H., and Bai, L. (2021). Thermodynamic modeling of genome-wide nucleosome depleted regions in yeast. *PLoS Comput Biol* *17*, e1008560. 10.1371/journal.pcbi.1008560.
- Kim, J.M., Visanpattanasin, P., Jou, V., Liu, S., Tang, X., Zheng, Q., Li, K.Y., Snedeker, J., Lavis, L.D., Lionnet, T., and Wu, C. (2021). Single-molecule imaging of chromatin remodelers reveals role of ATPase in promoting fast kinetics of target search and dissociation from chromatin. *Elife* *10*. 10.7554/eLife.69387.
- Kornberg, R.D. (2005). Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* *30*, 235-239. 10.1016/j.tibs.2005.03.011.
- Krietenstein, N., Wal, M., Watanabe, S., Park, B., Peterson, C.L., Pugh, B.F., and Korber, P. (2016). Genomic Nucleosome Organization Reconstituted with Pure Proteins. *Cell* *167*, 709-721 e712. 10.1016/j.cell.2016.09.045.
- Kubik, S., Bruzzone, M.J., Jacquet, P., Falcone, J.L., Rougemont, J., and Shore, D. (2015). Nucleosome Stability Distinguishes Two Different Promoter Types at All Protein-Coding Genes in Yeast. *Mol Cell* *60*, 422-434. 10.1016/j.molcel.2015.10.002.
- Kubik, S., O'Duibhir, E., de Jonge, W.J., Mattarocci, S., Albert, B., Falcone, J.L., Bruzzone, M.J., Holstege, F.C.P., and Shore, D. (2018). Sequence-Directed Action of RSC Remodeler and General Regulatory Factors Modulates +1 Nucleosome Position to Facilitate Transcription. *Mol Cell* *71*, 89-102 e105. 10.1016/j.molcel.2018.05.030.
- Lemon, B., Inouye, C., King, D.S., and Tjian, R. (2001). Selectivity of chromatin-remodelling cofactors for ligand-activated transcription. *Nature* *414*, 924-928. 10.1038/414924a.
- Li, Z., Vizeacoumar, F.J., Bahr, S., Li, J., Warringer, J., Vizeacoumar, F.S., Min, R., Vandersluis, B., Bellay, J., Devit, M., et al. (2011). Systematic exploration of essential yeast gene function with temperature-sensitive mutants. *Nat Biotechnol* *29*, 361-367. 10.1038/nbt.1832.
- Lorch, Y., Maier-Davis, B., and Kornberg, R.D. (2018). Histone Acetylation Inhibits RSC and Stabilizes the +1 Nucleosome. *Mol Cell* *72*, 594-600 e592. 10.1016/j.molcel.2018.09.030.
- Lorch, Y., Zhang, M., and Kornberg, R.D. (1999). Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* *96*, 389-392. 10.1016/s0092-8674(00)80551-6.
- Lorch, Y., Zhang, M., and Kornberg, R.D. (2001). RSC unravels the nucleosome. *Mol Cell* *7*, 89-95. 10.1016/s1097-2765(01)00157-5.
- Malabat, C., Feuerbach, F., Ma, L., Saveanu, C., and Jacquier, A. (2015). Quality control of transcription start site selection by nonsense-mediated-mRNA decay. *Elife* *4*, e06722. 10.7554/eLife.06722.
- Michel, B.C., D'Avino, A.R., Cassel, S.H., Mashtalir, N., McKenzie, Z.M., McBride, M.J., Valencia, A.M., Zhou, Q., Bocker, M., Soares, L.M.M., et al. (2018). A non-canonical SWI/SNF complex is a synthetic lethal target in cancers driven by BAF complex perturbation. *Nat Cell Biol* *20*, 1410-1420. 10.1038/s41556-018-0221-1.
- Nguyen, V.Q., Ranjan, A., Liu, S., Tang, X., Ling, Y.H., Wisniewski, J., Mizuguchi, G., Li, K.Y., Jou, V., Zheng, Q., et al. (2021). Spatiotemporal coordination of transcription preinitiation complex assembly in live cells. *Mol Cell* *81*, 3560-3575 e3566. 10.1016/j.molcel.2021.07.022.
- Patel, A.B., Moore, C.M., Greber, B.J., Luo, J., Zukin, S.A., Ranish, J., and Nogales, E. (2019). Architecture of the chromatin remodeler RSC and insights into its nucleosome engagement. *Elife* *8*. 10.7554/eLife.54449.

- Pelechano, V., Wei, W., and Steinmetz, L.M. (2013). Extensive transcriptional heterogeneity revealed by isoform profiling. *Nature* 497, 127-131. 10.1038/nature12121.
- Ramachandran, S., Zentner, G.E., and Henikoff, S. (2015). Asymmetric nucleosomes flank promoters in the budding yeast genome. *Genome Res* 25, 381-390. 10.1101/gr.182618.114.
- Rhee, H.S., and Pugh, B.F. (2012). Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature* 483, 295-301. 10.1038/nature10799.
- Soutourina, J. (2018). Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 262-274. 10.1038/nrm.2017.115.
- Soutourina, J., Bordas-Le Floch, V., Gendrel, G., Flores, A., Ducrot, C., Dumay-Odelot, H., Soularue, P., Navarro, F., Cairns, B.R., Lefebvre, O., and Werner, M. (2006). Rsc4 connects the chromatin remodeler RSC to RNA polymerases. *Mol Cell Biol* 26, 4920-4933. 10.1128/MCB.00415-06.
- Soutourina, J., Wydau, S., Ambroise, Y., Boschiero, C., and Werner, M. (2011). Direct interaction of RNA polymerase II and mediator required for transcription in vivo. *Science* 331, 1451-1454. 10.1126/science.1200188.
- Wagner, F.R., Dienemann, C., Wang, H., Stutzer, A., Tegunov, D., Urlaub, H., and Cramer, P. (2020). Structure of SWI/SNF chromatin remodeller RSC bound to a nucleosome. *Nature* 579, 448-451. 10.1038/s41586-020-2088-0.
- Ye, Y., Wu, H., Chen, K., Clapier, C.R., Verma, N., Zhang, W., Deng, H., Cairns, B.R., Gao, N., and Chen, Z. (2019). Structure of the RSC complex bound to the nucleosome. *Science* 366, 838-843. 10.1126/science.aay0033.
- Yen, K., Vinayachandran, V., Batta, K., Koerber, R.T., and Pugh, B.F. (2012). Genome-wide nucleosome specificity and directionality of chromatin remodelers. *Cell* 149, 1461-1473. 10.1016/j.cell.2012.04.036.
- Zhang, Z., Wippo, C.J., Wal, M., Ward, E., Korber, P., and Pugh, B.F. (2011). A packing mechanism for nucleosome organization reconstituted across a eukaryotic genome. *Science* 332, 977-980. 10.1126/science.1200508.

Figure 1

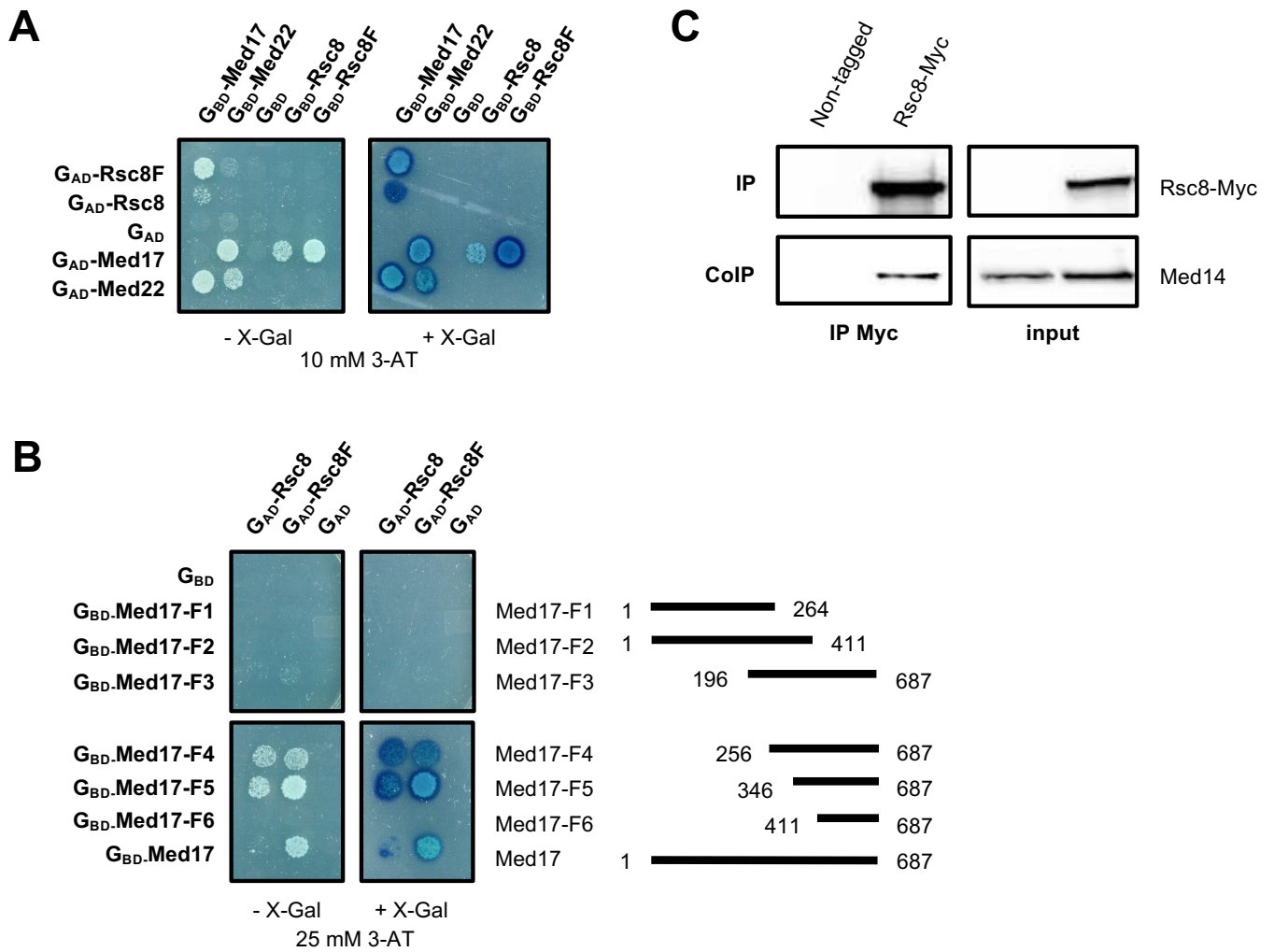


Figure 2

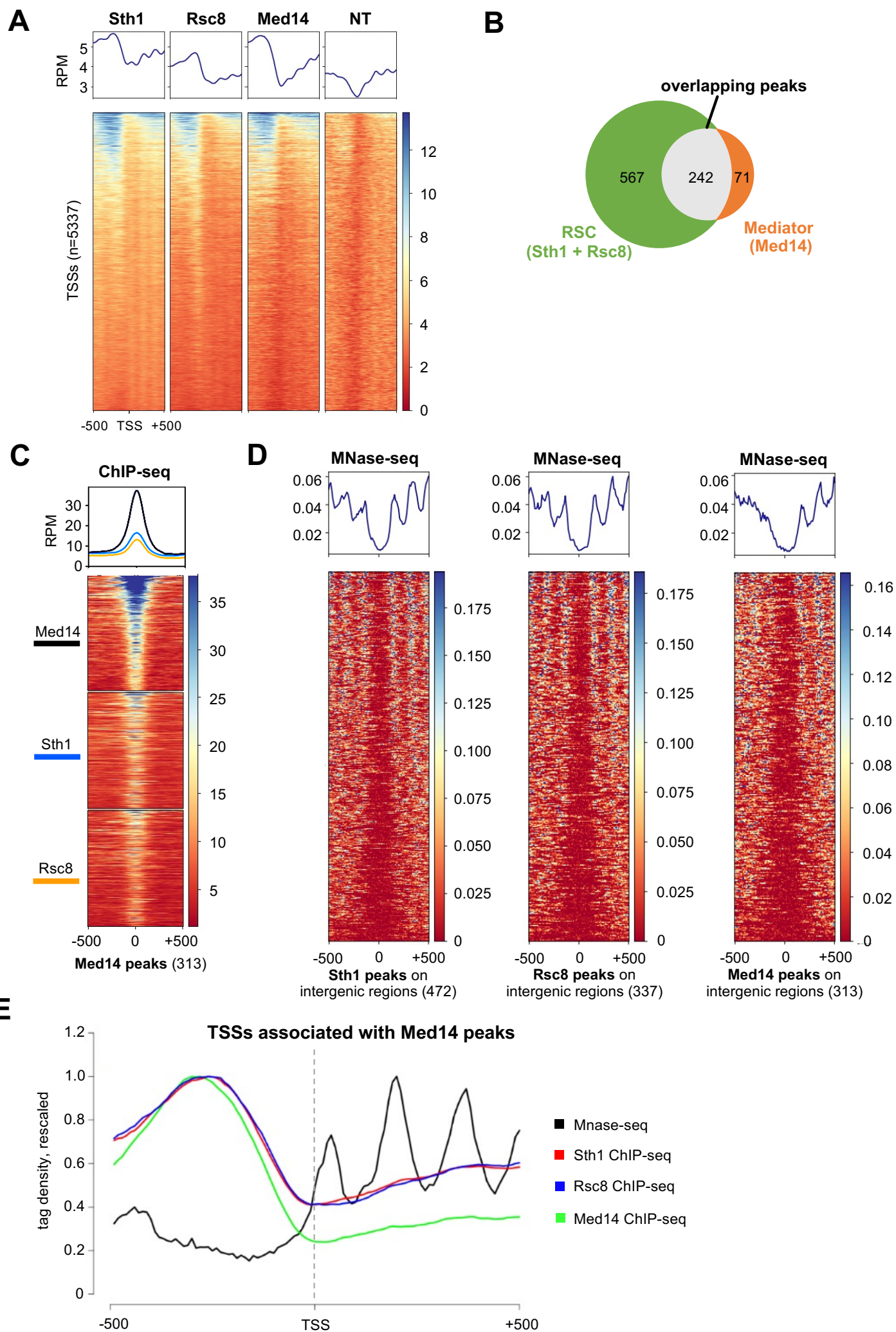


Figure 3

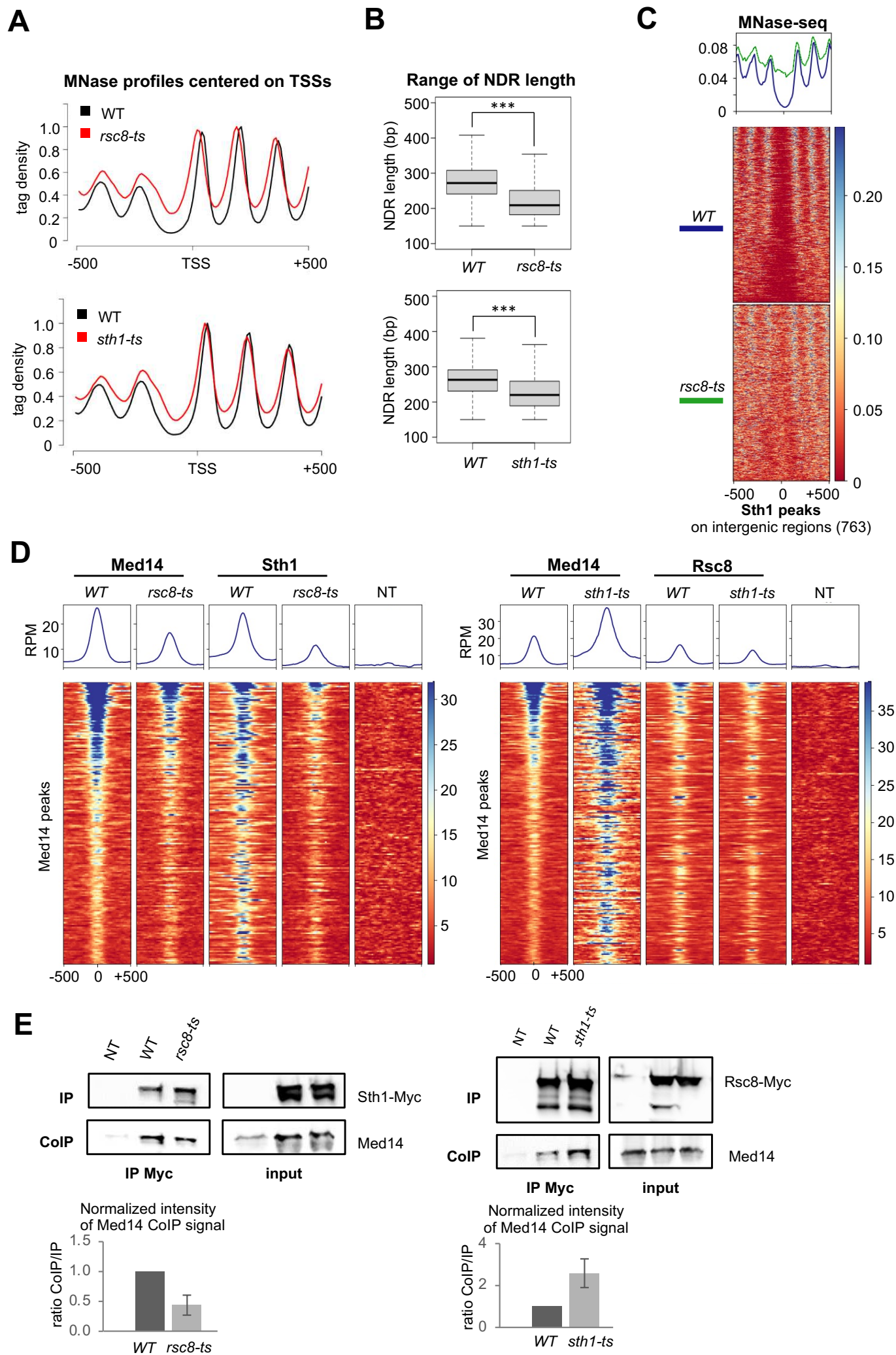


Figure 4

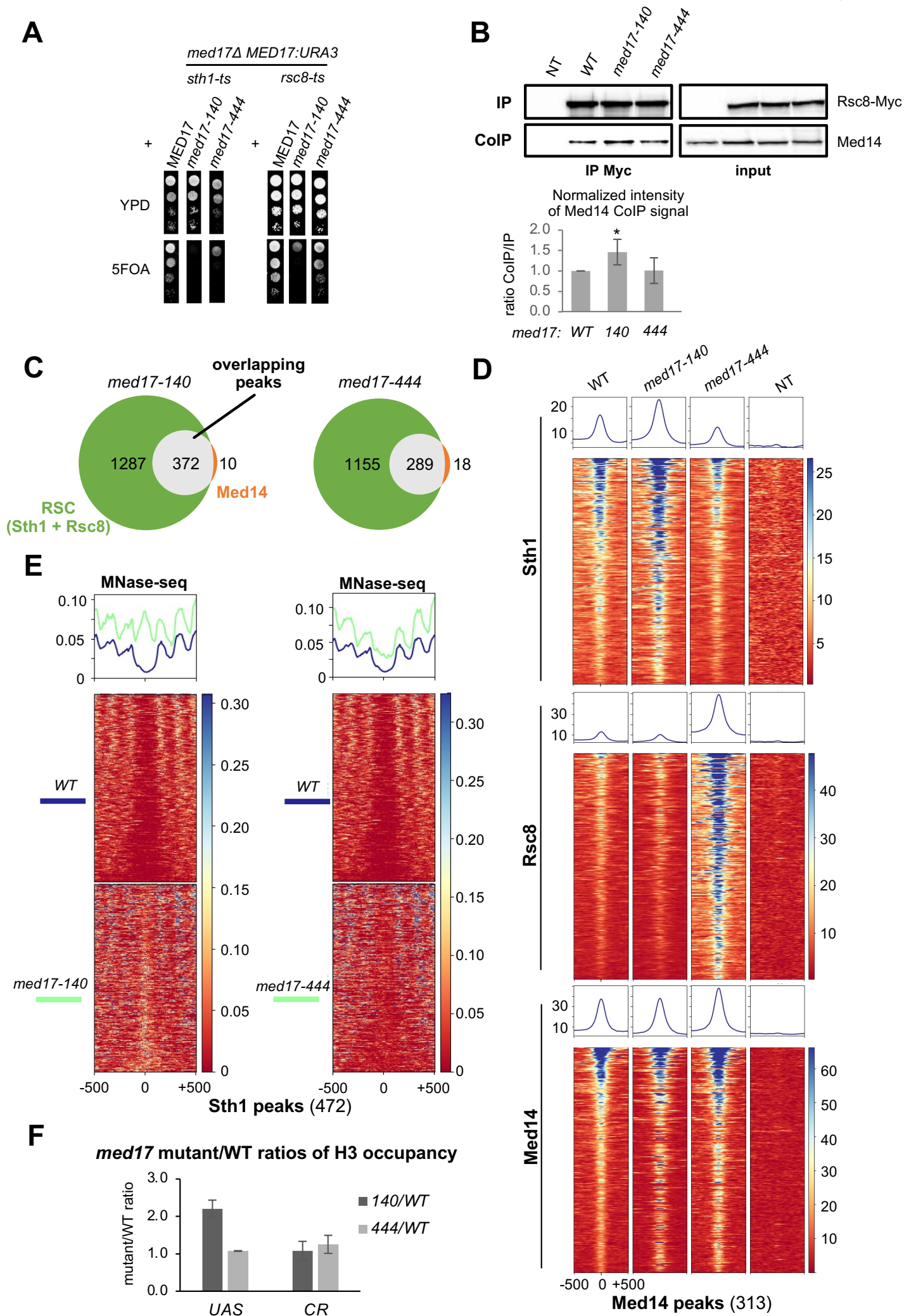


Figure 5

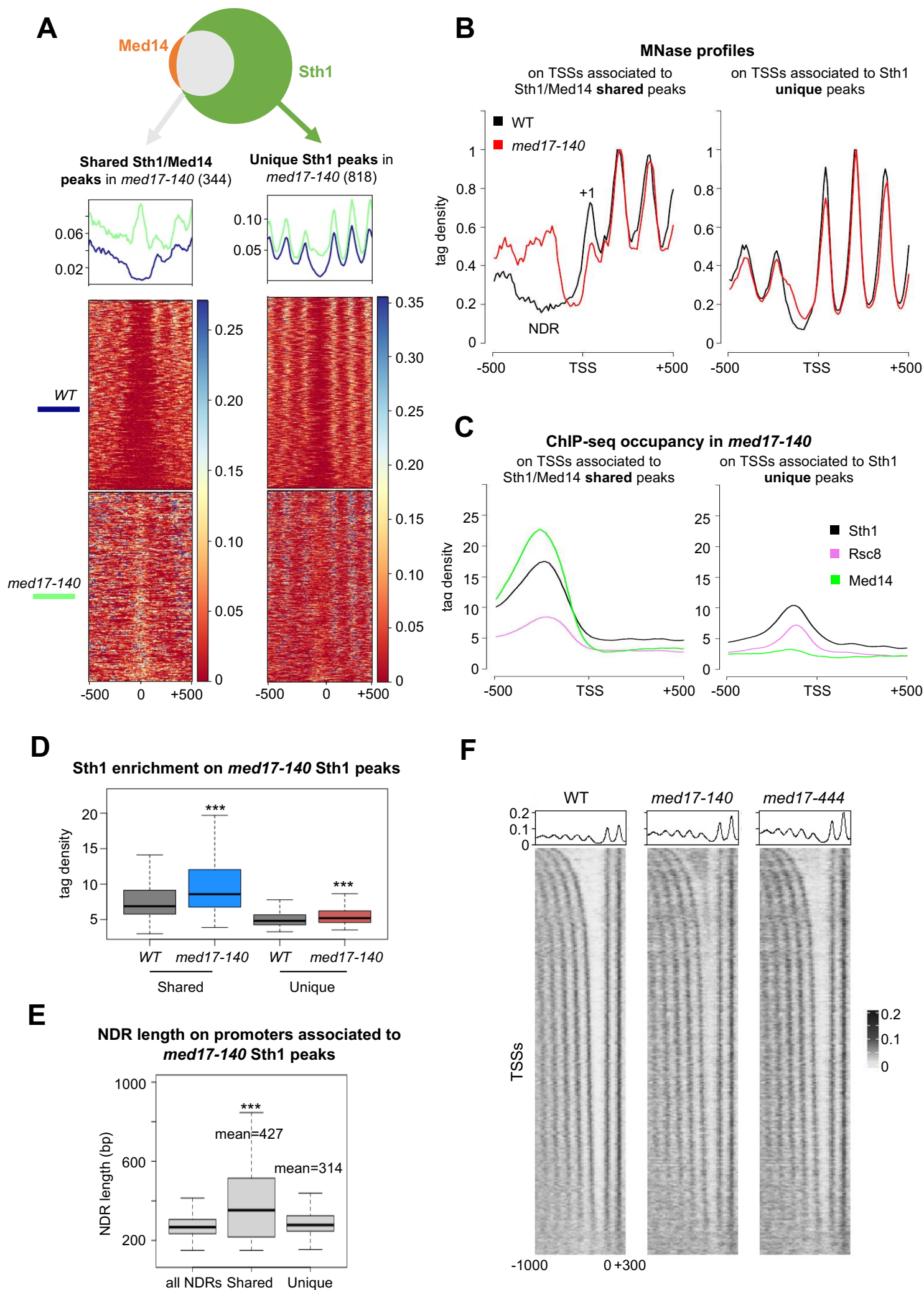
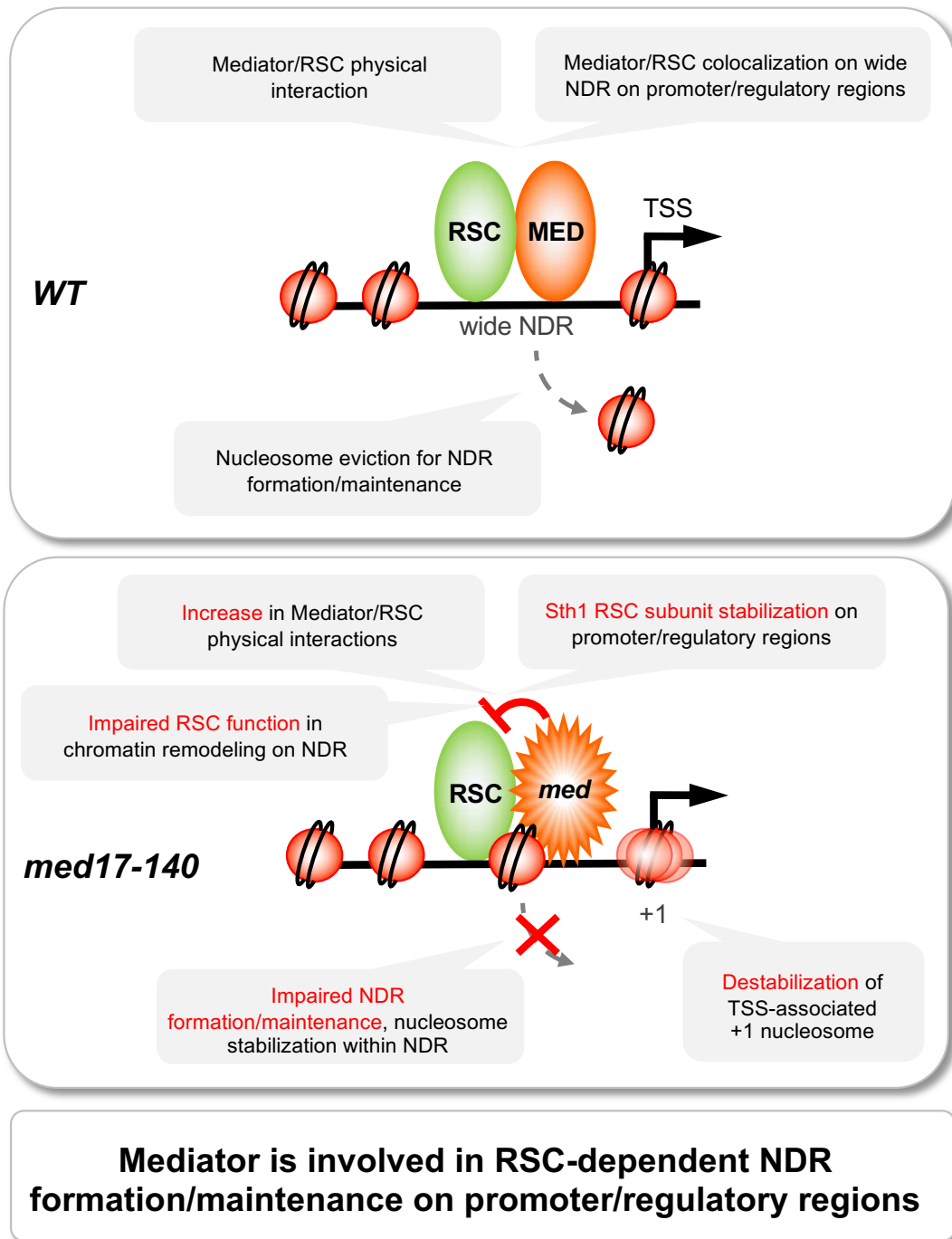
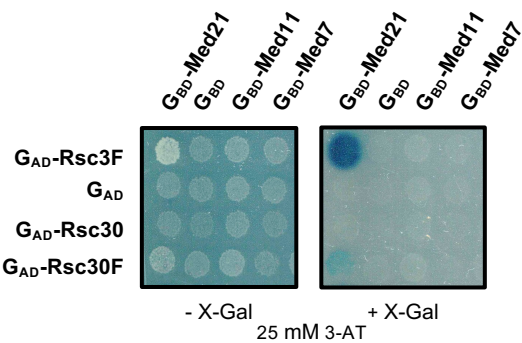
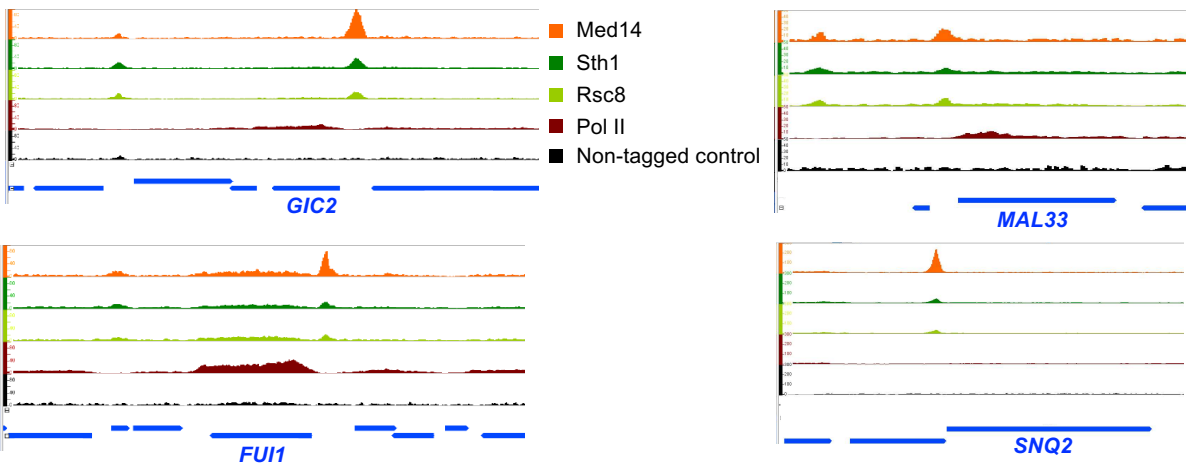


Figure 6

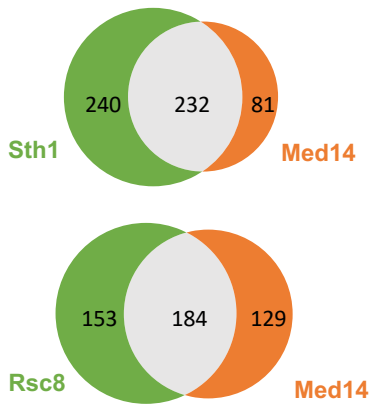




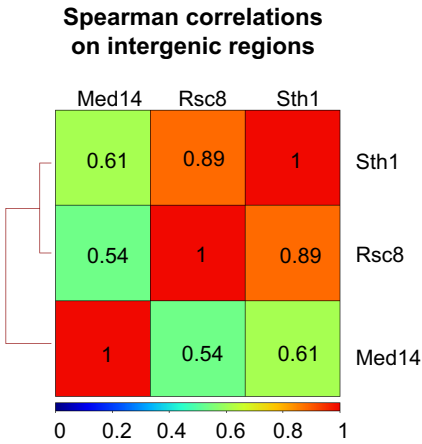
A



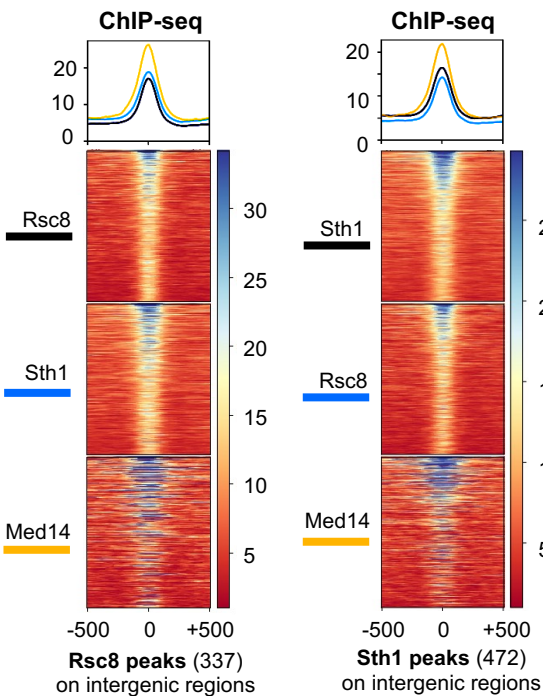
B



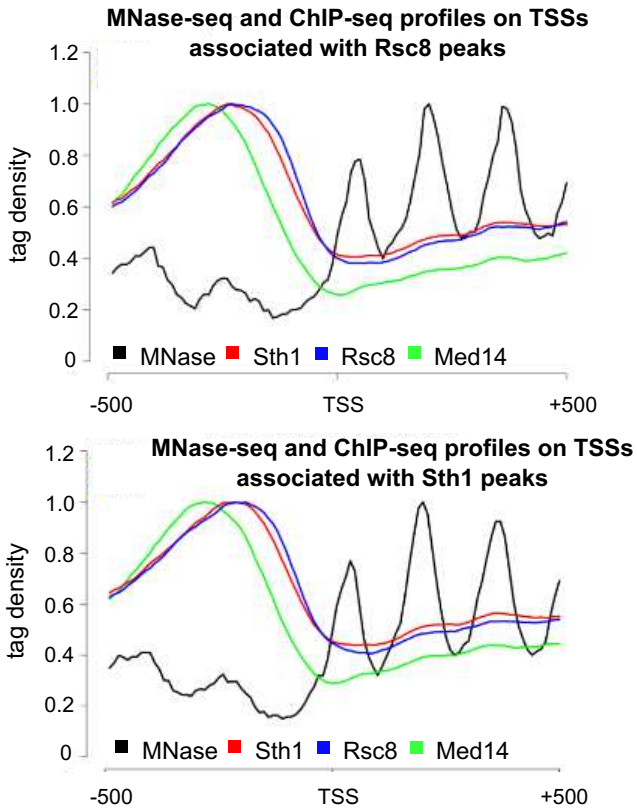
D



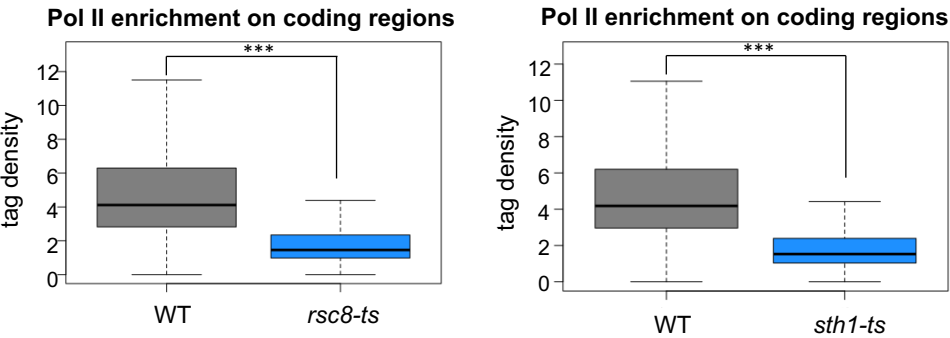
C



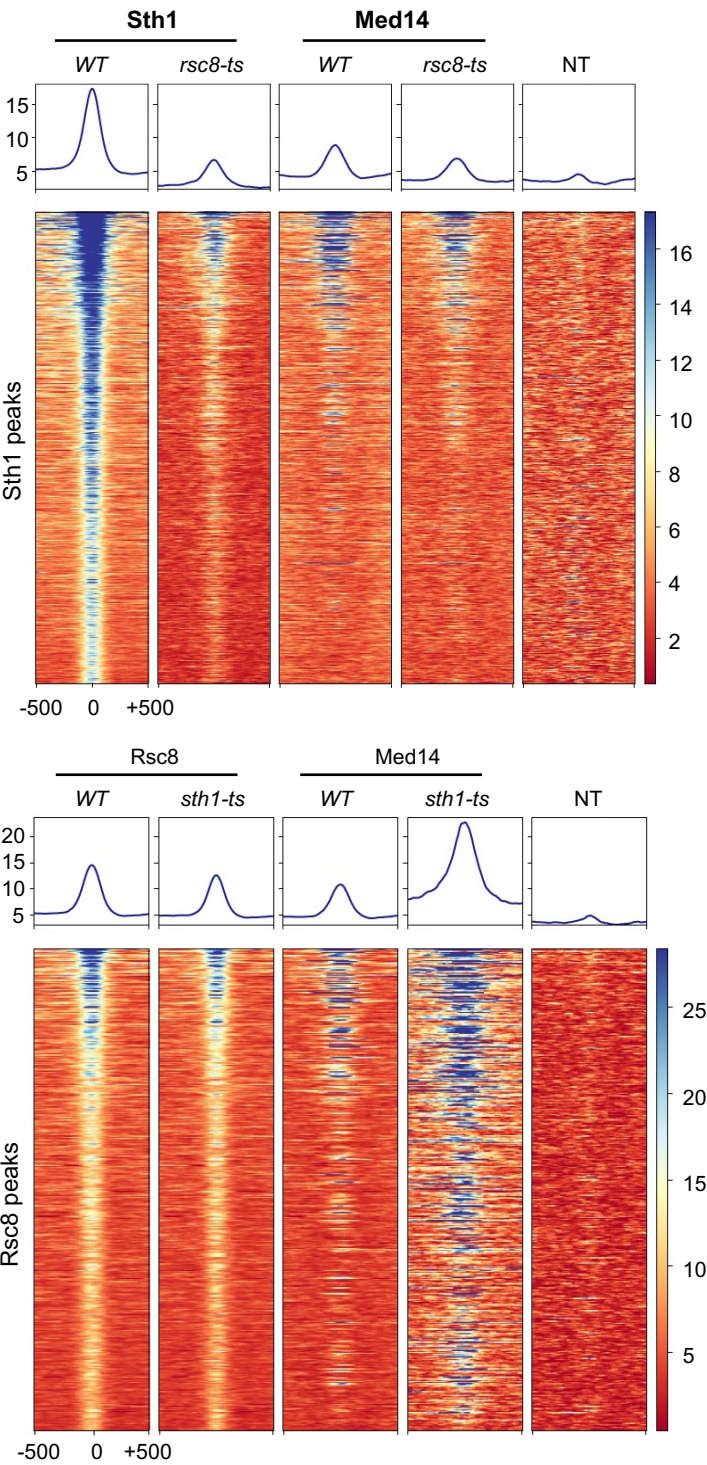
E

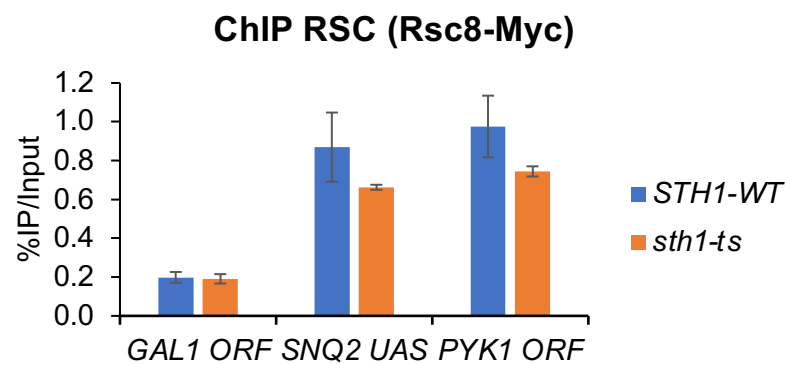
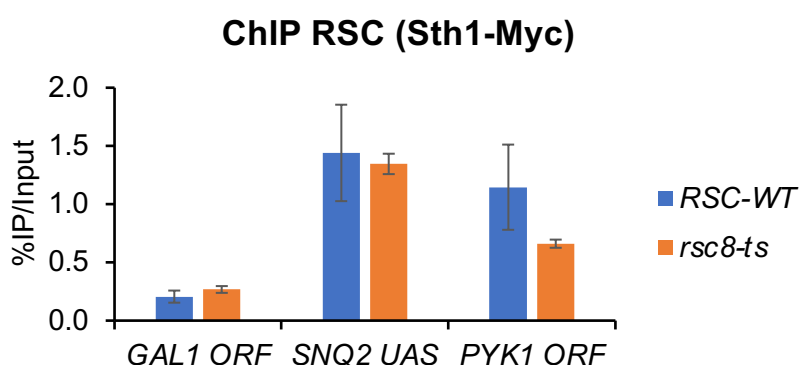
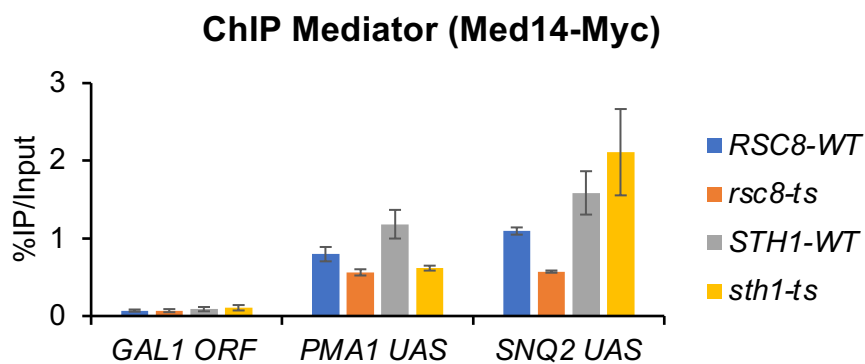
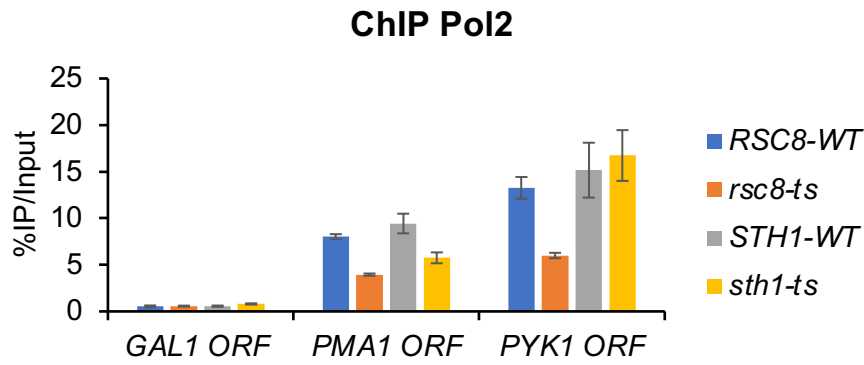


A



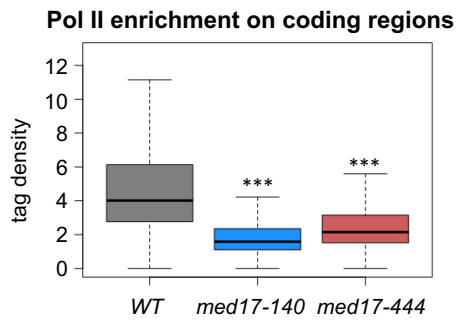
B



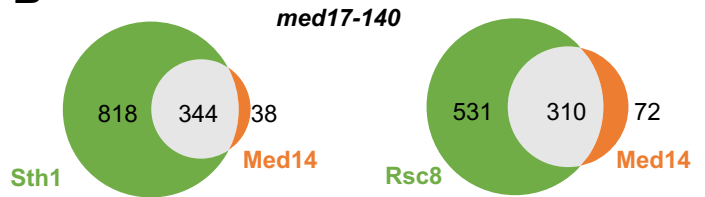


Supplementary Figure S5

A

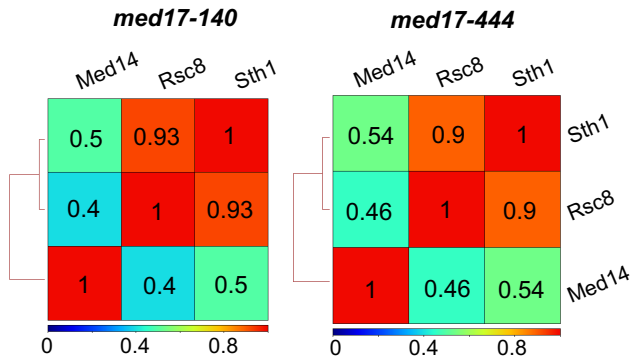


B

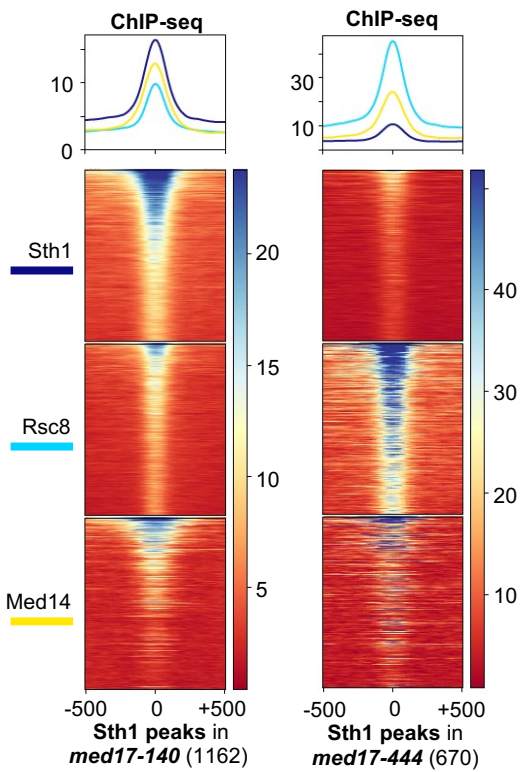


D

Spearman correlations on intergenic regions

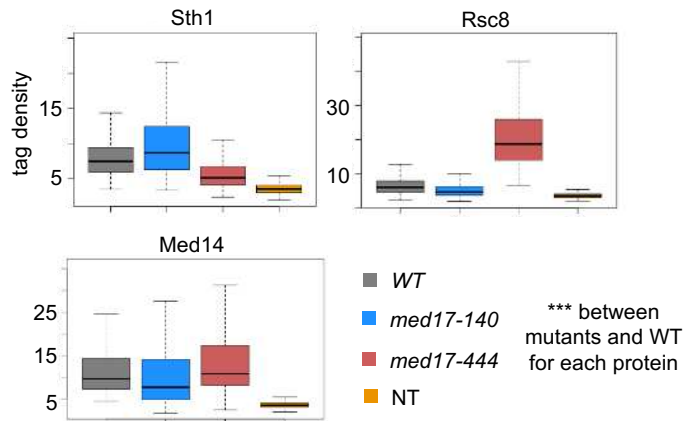


C



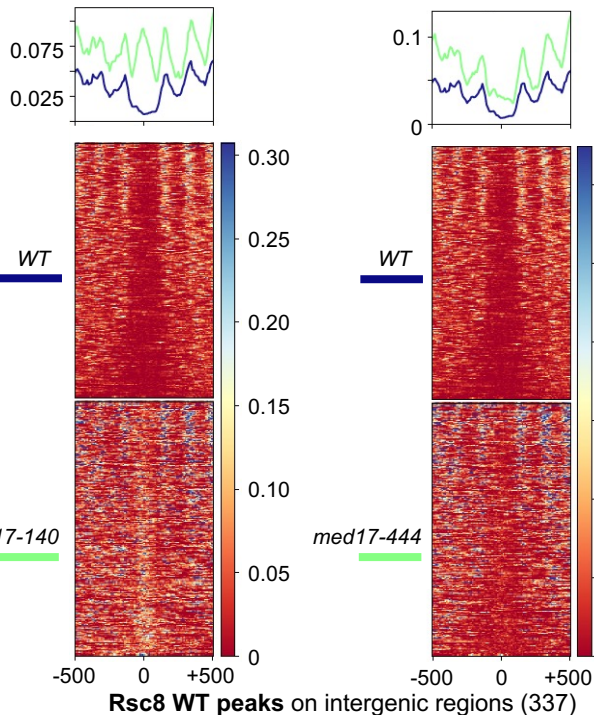
E

Enrichments on Mediator peaks

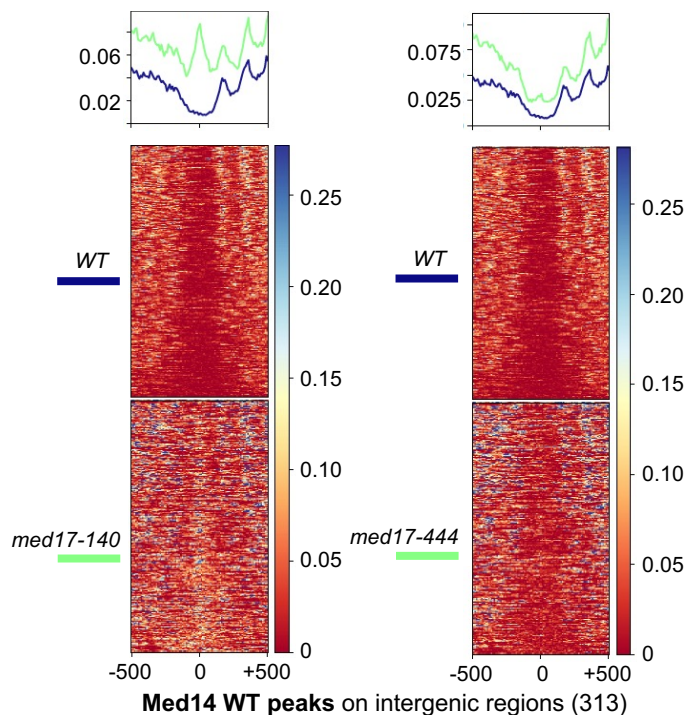


F

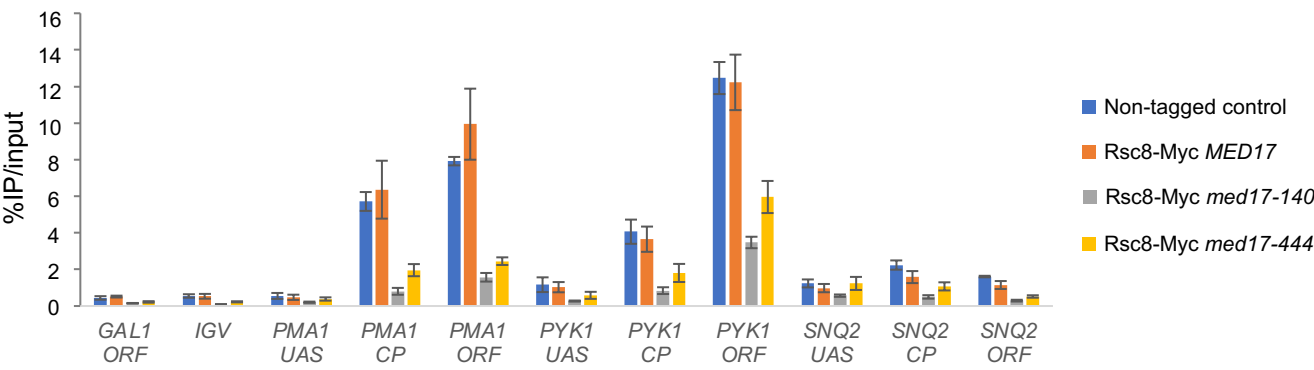
MNase-seq



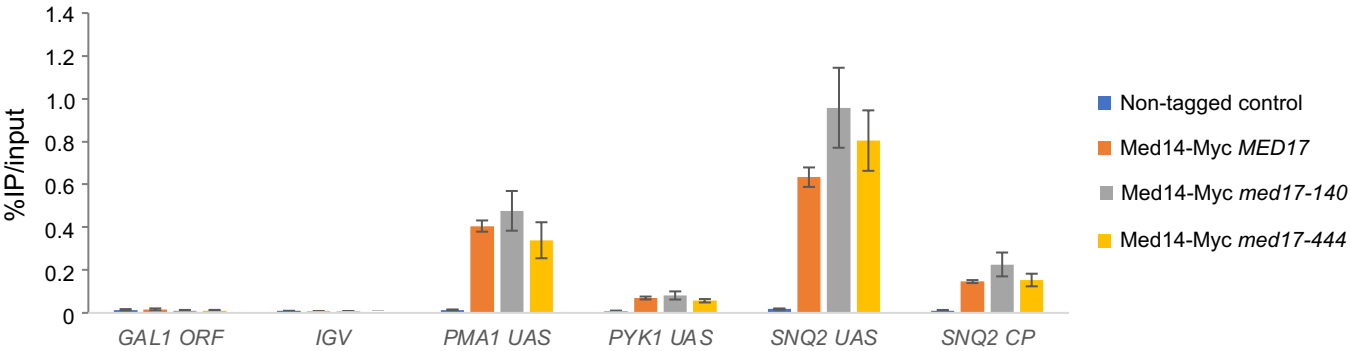
MNase-seq



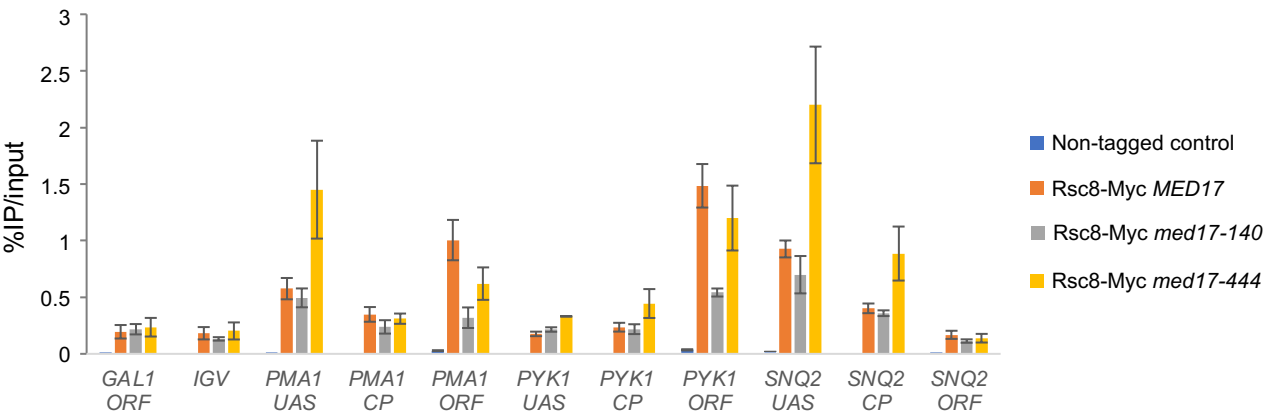
ChIP Pol II in *med17-140* and *med17-444*



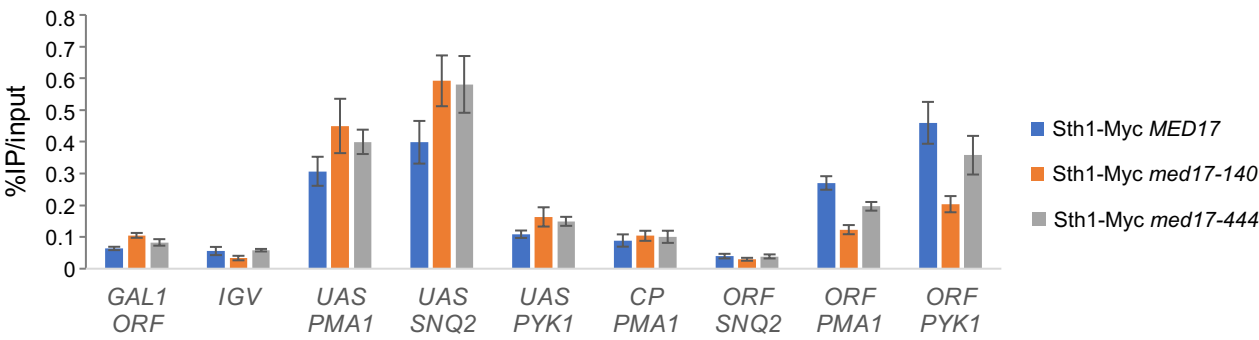
ChIP Mediator (Med14-Myc) in *med17-140* and *med17-444*



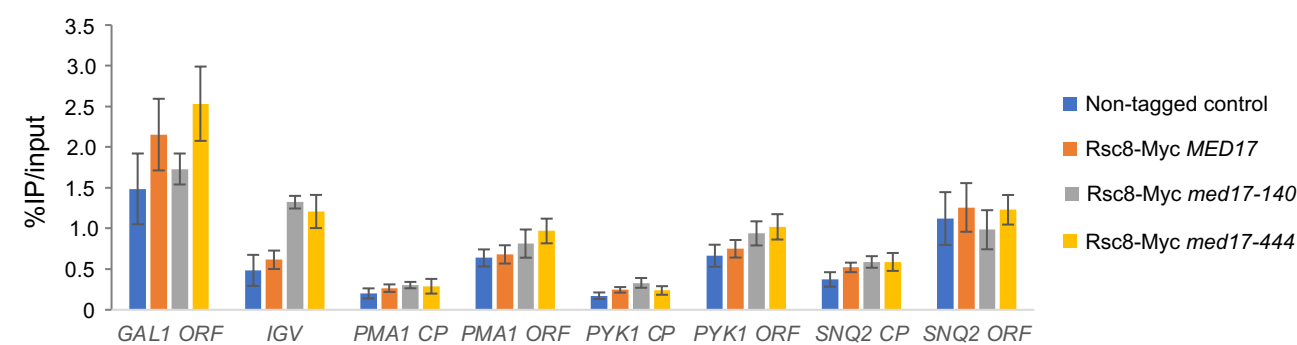
ChIP RSC (Rsc8-Myc) in *med17-140* and *med17-444*



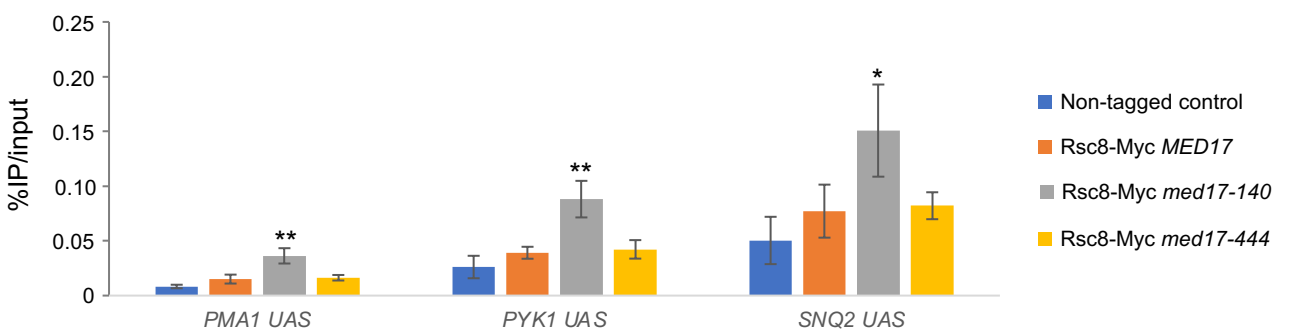
ChIP RSC (Sth1-Myc) in *med17-140* and *med17-444*



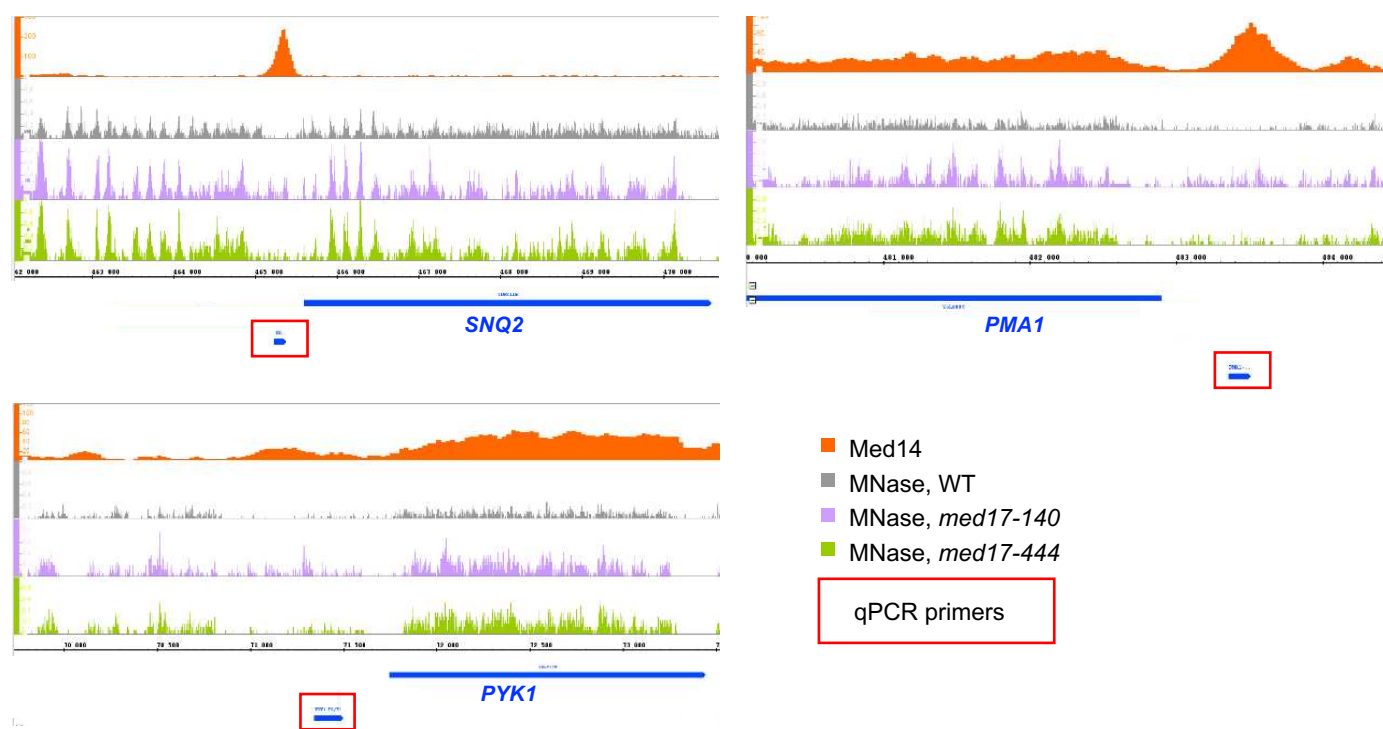
A ChIP H3 in *med17-140* and *med17-444*

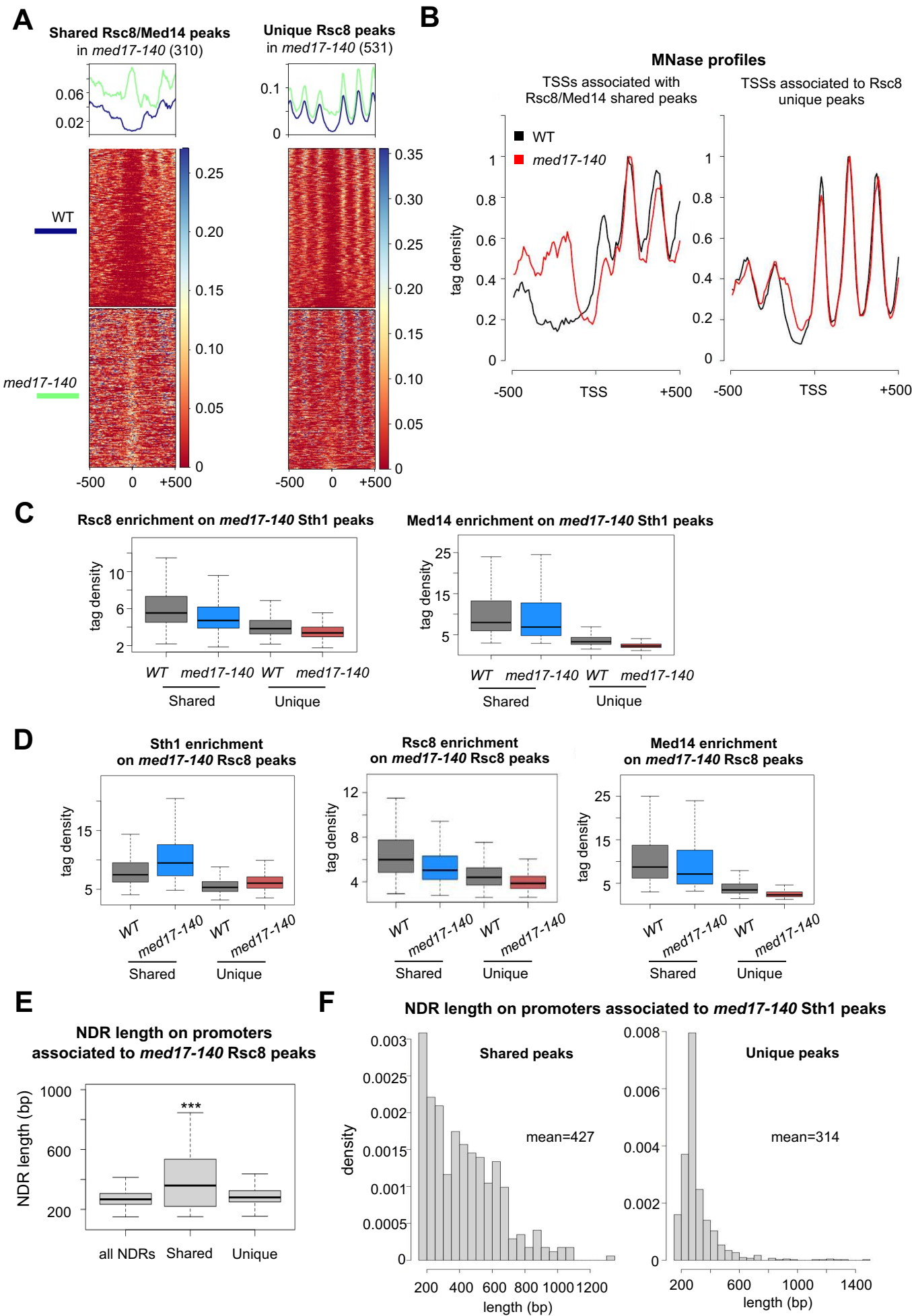


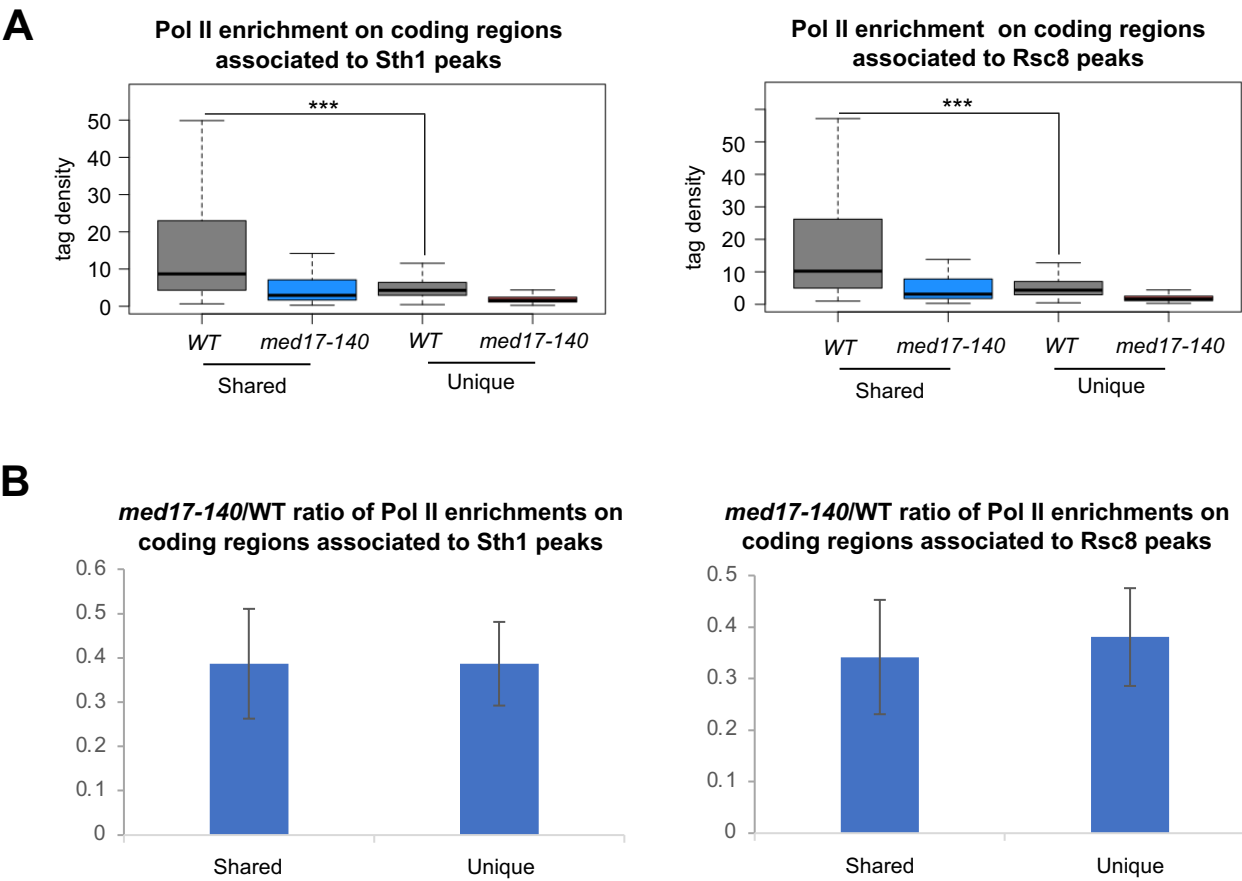
ChIP H3 in *med17-140* and *med17-444* on UASs



B







Supplementary Data

Functional interplay between Mediator and RSC chromatin remodeling complex controls nucleosome-depleted region maintenance at promoters

Kévin M. André, Nathalie Giordanengo Aiach, Veronica Martinez-Fernandez, Leo Zeitler, Arach Goldar, Michel Werner, Cyril Denby Wilkes, and Julie Soutourina

Supplementary Table S1. Yeast strains used in the study.

Strain name	Genotype	Collection #	Reference
Y187	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 ade2-101 trp1-901 leu2-3,112 gal4Δ met- gal80Δ MEL1 URA3 ::GAL1(UAS)- GAL1(TATA)-lacZ</i>	836	(Harper et al., 1993) ¹
Y190	<i>MATa gal4 gal80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3,112 URA3::GAL1::lacZ LYS2::GAL4(UAS)::HIS3 cyhRY</i>	837	(Harper et al., 1993) ¹
YPH499	<i>MATa ade2-1 lys2-801 ura3-52 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2Δ</i>	97	(Sikorski & Hieter, 1989) ²
med17Δ/MED17 TRP Rsc8-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 Δmed17::kan::ADE2 MED17:CEN:TRP1 RSC8:13MYC:KANMX</i>	7977	This work
med17Δ/med17-140 (Q444P M442L) TRP Rsc8-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 Δmed17::kan::ADE2 med17-140:CEN:TRP1 RSC8:13MYC:KANMX</i>	7978	This work
med17Δ/med17-444 (Q444P) TRP Rsc8-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 Δmed17::kan::ADE2 med17-444:CEN:TRP1 RSC8:13MYC:KANMX</i>	7979	This work
med17Δ/MED17 TRP Sth1-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 Δmed17::kan::ADE2 MED17:CEN:TRP1 STH1:13MYC:KANMX</i>	7982	This work
med17Δ/med17-140 (Q444P M442L) TRP Sth1-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 Δmed17::kan::ADE2 med17-140:CEN:TRP1 STH1:13MYC:KANMX</i>	7983	This work
med17Δ/med17-444 (Q444P) TRP Sth1-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 ade2-101uaa trp1-Δ63 lys2-801uag leu2-Δ1 Δmed17::kan::ADE2 med17-444:CEN:TRP1 STH1:13MYC:KANMX</i>	7984	This work
med17Δ/MED17 TRP Med14-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-D200 ade2-101uaa trp1-D63 lys2-801uag leu2-D1 Δmed17::kan::ADE2 MED14Myc HIS CEN MED17 TRP</i>	7995	This work

med17Δ/med17-140 (Q444P M442L) TRP Med14-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-D200 ade2-101uaa trp1-D63 lys2-801uag leu2-D1 Δmed17::kan::ADE2 MED14Myc HIS CEN med17-140 TRP</i>	7996	This work
med17Δ/med17-444 (Q444P) TRP Med14- Myc	<i>MATa ura3-52 his3-D200 ade2-101uaa trp1-D63 lys2-801uag leu2-D1 Δmed17::kan::ADE2 MED14Myc HIS CEN med17-444 TRP</i>	7998	This work
med17Δ/MED17 URA3 Med14-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-D200 ade2-101uaa trp1-D63 lys2-801uag leu2-D1 Δmed17::kan::ADE2 MED17 CEN URA3 MED14::13myc::HIS3MX6</i>	7987	This work
med17Δ/MED17 URA3 rsc8-ts (G326D I417F K446M) Med14-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-D200 ade2-101uaa trp1-D63 lys2-801uag leu2-D1 Δmed17::kan::ADE2 MED17 CEN URA3 MED14::13myc::HIS3MX6 rsc8- ts21 (G326D, I417F, K446M)::KanR</i>	8026	This work
med17Δ/MED17 URA3 sth1-ts (P646L F655L D657G N1077S F1125L) Med14-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-D200 ade2-101uaa trp1-D63 lys2-801uag leu2-D1 Δmed17::kan::ADE2 MED17 CEN URA3 MED14::13myc::HIS3MX6 sth1- ts (P646L, F655L, D657G ,N1077S,F1125L)</i>	8034	This work
med17Δ/MED17 URA3 Rsc8-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-D200 ade2-101uaa trp1-D63 lys2-801uag leu2-D1 Δmed17::kan::ADE2 MED17 CEN URA3 RSC8::13MYC::KAN::LEU2</i>	7989	This work
med17Δ/MED17 URA3 sth1-ts (P646L F655L D657G N1077S F1125L) Rsc8-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-D200 ade2-101uaa trp1-D63 lys2-801uag leu2-D1 Δmed17::kan::ADE2 MED17 CEN URA3 RSC8::13MYC::KAN::LEU2 sth1-ts(P646L F655L, D657G ,N1077S,F1125L)</i>	8069	This work
med17Δ/MED17 URA3 Sth1-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-D200 ade2-101uaa trp1-D63 lys2-801uag leu2-D1 Δmed17::kan::ADE2 MED17 CEN URA3 STH1::13MYC::KAN::LEU2</i>	7988	This work
med17Δ/MED17 URA3 rsc8-ts (G326D I417F K446M) Sth1-Myc	<i>MATa ura3-52 his3-D200 ade2-101uaa trp1-D63 lys2-801uag leu2-D1 Δmed17::kan::ADE2 MED17 CEN URA3 STH1::13MYC::KAN::LEU2 rsc8- ts21(G326D, I417F, K446M)::KanR</i>	8068	This work

¹ Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816.

² Sikorski RS, Hieter P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19-27.

Supplementary Table S2. Spike-in parameters for ChIP-seq.

<i>S. cerevisiae</i> strain	IP	Spike-in fraction (%)	<i>S. pombe</i> strain
med17 mutants	Pol II	5	Rif1-Myc

<i>med17</i> mutants	Rsc8-Myc	10	Rif1-Myc
<i>med17</i> mutants	Med14-Myc	10	Med4-Myc
<i>med17</i> mutants	Sth1-Myc	20	Rif1-Myc
Non-tagged	Myc	10	Rif1-Myc
<i>rsc8</i> mutant	Med14-Myc	20	Med7-Myc
<i>rsc8</i> mutant	Pol II	10	Med7-Myc
<i>rsc8</i> mutant	Sth1-Myc	20	Med7-Myc
<i>sth1</i> mutant	Med14-Myc	20	Med7-Myc
<i>sth1</i> mutant	Pol II	10	Med7-Myc
<i>sth1</i> mutant	Rsc8-Myc	20	Med7-Myc

Supplementary Table S3. Oligonucleotides used in the study.

qPCR primers	SEQUENCE	Primer pair
GAL1 ORF	GAL1-O1 / O2	AAAGAACTTGCACCGGAAA/ GGCCCATATTCGCTTTAACA
IGV	IGV-3 / 4	TTCATTTGCAATTTGCAGTTCA/ CAGCCAGGAAGAATCTCACAA
PYK1 UAS	PYK1-P1 / P2	CGCACCGTCACAAAGTGTT/ TGGAAGGAAAGGAAATCAC
PYK1 CP	PYK1-P3 / P4	CCTTTCCTTCCCATATGATGC/ ACTTTGAAAGGGGACCATGA
PYK1 ORF	PYK1-O1 / O2	ATGGTTGCCAGAGGTGACTT/ TCTGGTTGGTCTTGGGTTGT
PMA1 UAS	PMA1-P3 / P4	AACAAACCCGGTCTCGAAG/ GAAGTGCCGCATTAGGAAAT
PMA1 CP	PMA1-378f / 235r	GATGGTGGGTACCGCTTATG/ TTGGTGTATAGGAAAGAAAGAGAAAA
PMA1 ORF	PMA1-O1 / O2	GGTTTTGGTCATTGCCACTT/ ACGGCCATAGTGGTGGTAAC
SNQ2 UAS	SNQ2-P1N / P2N	TCACCCCATTTGGAAAAGAA/ TAGTCATATGTGCGCGGAAC
SNQ2 CP	SNQ2-P3N / P4N	GCCCATTTCGGTTTAAATCC/ GAGGGAGGGGCACTACTCAT
SNQ2 ORF	SNQ2-O1 / O2	GTTTCAGAGGCGATCAATGGT/ ATCGAAGGCAATTGGATCAT

Supplementary Table S4. Number of mapped reads and normalization coefficient of each sequencing sample.

Sample	Number of mapped reads on <i>S. cerevisiae</i>	Normalization factor
Input_Rsc8-Myc_WT	22977800	1
Pol II_Rsc8-Myc_WT	16516026	1
Pol II_Rsc8-Myc_med17-140	9995666	0.39
Pol II_Rsc8-Myc_med17-444	12849238	0.49
Rsc8_Rsc8-Myc_WT	10784068	1
Rsc8_Rsc8-Myc_med17-140	10747200	0.67
Rsc8_Rsc8-Myc_med17-444	9942148	1.69
Med14_Med14-Myc_WT	3993990	1
Med14_Med14-Myc_med17-140	3186594	0.7
Med14_Med14-Myc_med17-444	2785480	1.12

Sth1_Sth1-Myc_WT	17239958	1
Sth1_Sth1-Myc_med17-140	16445980	0.83
Sth1_Sth1-Myc_med17-444	18320564	0.67
Med14_Med14-Myc_WT6h	10865416	1
Med14_Med14-Myc_rsc8-ts	5973146	0.91
Pol II_Med14-Myc_WT6h	19463068	1
Pol II_Med14-Myc_rsc8-ts	13954246	0.39
Sth1_Sth1-Myc_WT6h	19800880	1
Sth1_Sth1-Myc_rsc8-ts	5820932	0.84
Med14_Med14-Myc_WT2h	13006740	1
Med14_Med14-Myc_sth1-ts	3424764	1.39
Pol II_Med14-Myc_WT2h	21245530	1
Pol II_Med14-Myc_sth1-ts	19081108	0.38
Rsc8_Rsc8-Myc_WT2h	23298254	1
Rsc8_Rsc8-Myc_sth1-ts	20475408	0.98
IP-Myc_non-tagged_strain_WT	2167402	1
MNase_Rsc8-Myc_WT	24773602	1
MNase_Rsc8-Myc_med17-140	16600296	1
MNase_Rsc8-Myc_med17-444	16341674	1
MNase_Med14-Myc_WT6	20707292	1
MNase_Med14-Myc_rsc8-ts	18523968	1
MNase_Med14-Myc_WT2	22068258	1
MNase_Med14-Myc_sth1-ts	20485700	1

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure S1. Med21 interacts with a fragment of Rsc3. Gal4 DNA-binding domain (G_{BD}), alone or in fusion with full length Med21, Med11 or Med7, was co-expressed with Gal4 activation domain (G_{AD}) alone or in fusion with full length Rsc30, partially truncated Rsc30 (Rsc30F: amino acids 644-883) or partially truncated Rsc3 (Rsc3F: amino acids 588-695). Yeast cells were spotted on SD+2A medium supplemented with 25 mM 3-AT, grown for 3 days (left panel) and then stained with X-Gal for 24h (right panel).

Supplementary Figure S2. Mediator and RSC colocalize on NDRs within promoter regions. (A) Average tag densities of Med14, Sth1, Rsc8, Pol II and IP Myc in a non-tagged strain on *GIC2*, *FU11*, *MAL33* and *SNQ2* genes. (B) Venn diagrams illustrating the number of Med14 peaks that overlap or not with Sth1 and Rsc8 peaks. (C) Heat maps and average profiles of Med14-Myc, Sth1-Myc and Rsc8-Myc centered on Rsc8 and Sth1 peaks within intergenic

regions, -500 bp to +500 bp. Signals are expressed as the normalized read counts. **(D)** Spearman correlation coefficients of ChIP-seq data between Med14, Rsc8 and Sth1 on intergenic regions. The colors correspond to the scale for Spearman correlation coefficients indicated on the bottom. **(E)** Sth1, Rsc8, Med14 and MNase profiles centered on TSSs associated to Rsc8 and Sth1 peaks, -500 bp to +500 bp. The profiles were normalized for comparison by rescaling their maximum values to 1.

Supplementary Figure S3. Effects of *rsc* mutations on Pol II, Med14 and RSC chromatin occupancy. **(A)** Boxplots showing the Pol II enrichment in WT, *rsc8-ts* and *sth1-ts* strains. The three asterisks represent a significant difference between the WT and the mutant at P-value < 0.001 in a Wilcoxon test. **(B)** Top panel: heatmaps and average profiles of Med14-Myc and Sth1-Myc ChIP-seq signals centered on Sth1 WT peaks (n=763, -500 bp to +500 bp) in WT or *rsc8-ts*. Bottom panel: heat maps and average profiles of Med14-Myc and Rsc8-Myc ChIP-seq signals in WT or *sth1-ts* centered on Rsc8 WT peaks (n=464), -500 bp to +500 bp. Negative control was obtained from a Myc IP in a non-tagged strain (NT). Signals are expressed as the normalized read counts.

Supplementary Figure S4. Effects of *rsc* mutations on Pol II, Med14 and RSC chromatin occupancy. Quantitative ChIP analysis of Pol II, Mediator, Sth1 and Rsc8 occupancies following a 6-hour or 2.5-hour shift at 37°C (for *rsc8-ts* and *sth1-ts*, respectively), after reaching exponential phase at 25°C. Quantitative PCR (qPCR) was performed on precipitated DNA, using primer pairs designed to amplify either regions in open reading frames (ORF) or upstream activating sequences (UAS). Relative quantity of an amplicon was determined by comparing the obtained Ct to a standard curve made on the same qPCR plate. Quantities were reported to qPCR performed on input DNA and are expressed as a percentage. *GALI* ORF amplicon was

used as a negative control. The indicated value is the mean of three biological replicates, and error bars represents the standard deviation.

Supplementary Figure S5. Effect of Mediator mutations on NDRs and protein occupancies. (A) Boxplots showing the Pol II enrichment in WT, *med17-140* and *med17-444* strains. The three asterisks represent a significant difference between the WT and the mutant at P-value < 0.001 in a Wilcoxon test. (B) Venn diagrams illustrating the number of Med14 peaks that overlap or not with Sth1 (left) and Rsc8 (right) peaks in *med17-140*. (C) Heat maps and average profiles of Med14-Myc, Sth1-Myc and Rsc8-Myc centered on Sth1 peaks within intergenic regions, -500 bp to +500 bp, in *med17-140* (left panel) or *med17-444* (right panel). Signals are expressed as the normalized read counts. (D) Spearman correlation coefficients of ChIP-seq data between Med14, Rsc8 and Sth1 on intergenic regions in *med17-140* (left panel) and *med17-444* (right panel). The colors correspond to the scale for Spearman correlation coefficients indicated on the bottom. (E) Boxplots showing the Sth1 (top left), Rsc8 (top right) and Med14 (bottom left) enrichments on WT Mediator peaks in WT, *med17-140* and *med17-444* strains. The three asterisks represent a significant difference between the WT and the mutant at P-value < 0.001 in a Wilcoxon test. Negative control was obtained from a Myc IP in a non-tagged strain (NT). (F) Heat maps and average MNase profiles in WT, *med17-140* and *med17-444* strains centered on Rsc8 (left panels) or Med14 (right panels) peaks within intergenic regions (n=337 and 313, respectively), -500 bp to +500 bp. Signals are expressed as the normalized read counts.

Supplementary Figure S6. Effects of *med17* mutations on Pol II, Med14 and RSC chromatin occupancy. Quantitative ChIP analysis of Pol II, Med14, Sth1 and Rsc8 occupancies following a 45-min shift at 37°C, after reaching exponential phase at 30°C.

Quantitative PCR (qPCR) was performed on precipitated DNA, using primer pairs designed to amplify either regions in open reading frames (ORF), upstream activating sequences (UAS) or core promoters (CP). Relative quantity of an amplicon was determined by comparing the obtained Ct to a standard curve made on the same qPCR plate. Quantities were reported to qPCR performed on input DNA and are expressed as a percentage. *GAL1* ORF and *IGV* (intergenic region on chromosome V) amplicons were used as negative controls. The indicated value is the mean of three biological replicates, and error bars represents the standard deviation.

Supplementary Figure S7. H3 occupancy is increased on promoters in *med17-140*. (A)

Quantitative ChIP analysis of H3 occupancy following a 45-min shift at 37°C, after reaching exponential phase at 30°C. Quantitative PCR (qPCR) was performed on precipitated DNA, using primer pairs designed to amplify either regions in open reading frames (ORF), upstream activating sequences (UAS) or core promoters (CP). Relative quantity of an amplicon was determined by comparing the obtained Ct to a standard curve made on the same qPCR plate. Quantities were reported to qPCR performed on input DNA and are expressed as a percentage. *GAL1* ORF and *IGV* (intergenic region on chromosome V) amplicons were used as non-transcribed controls. The indicated value is the mean of three biological replicates, and error bars represents the standard deviation. The two asterisks represent a significant difference between the WT and the mutant at P-value < 0.01 in a Student t-test, while the single asterisk represents a significant difference at P-value < 0.05. (B) Examples of MNase-seq profiles in WT and *med17* mutants on selected UASs. Average tag density of Med14 ChIP-seq in WT is also shown in orange. Positions of qPCR primers for UASs are indicated by red boxes.

Supplementary Figure S8. NDRs are disturbed in *med17-140* on promoters enriched by both Mediator and RSC. (A) Heat maps and average MNase profiles from the WT and *med17-*

140 strains centered on *med17-140* Rsc8 peaks within intergenic regions that overlap (left panel) or not (right panel) with Med14 peaks (n=310 and 531, respectively), -500 bp to +500 bp. Signals are expressed as the normalized read counts. **(B)** Average MNase profiles in WT and *med17-140* centered on TSSs associated to Rsc8/Med14-shared peaks (n=310) or Rsc8 only (n=531), -500 bp to +500 bp. The profiles were normalized for comparison by rescaling their maximum values to 1. **(C)** Boxplots showing Rsc8 and Med14 enrichments (left and right panels, respectively) in WT and *med17-140* on *med17-140* Sth1 peaks that overlap (termed shared) or not (termed unique) with Med14 peaks. **(D)** Boxplots showing Sth1, Rsc8 and Med14 enrichments (left, middle and right panels, respectively) in WT and *med17-140* on *med17-140* Rsc8 peaks that overlap (termed shared) or not (termed unique) with Med14 peaks. **(E)** Boxplots showing the NDR lengths on promoters enriched by both Rsc8 and Med14 (termed shared) or Rsc8 only (termed unique), in comparison to all NDRs. The three asterisks represent a significant difference between the Rsc8/Med14-associated NDRs and all NDRs or Rsc8-associated NDRs at P-value < 0.001 in a Wilcoxon test. **(F)** Density plot showing NDR length distribution for promoter NDRs associated to Med14 and Sth1 (left) or Sth1 only (right).

Supplementary Figure S9. Genes associated to shared Mediator/RSC peaks are more occupied by Pol II than genes associated to unique RSC peaks. **(A)** Boxplots showing Pol II enrichment in WT and *med17-140* on *med17-140* Sth1 and Rsc8 peaks that overlap (termed shared) or not (termed unique) with Med14 peaks. **(B)** *med17-140*/WT ratios of Pol II occupancy on coding regions associated to Sth1 and Rsc8 peaks (left and right panels, respectively), shared between RSC and Mediator or unique. Ratios were calculated from the mean Pol II tag densities on coding regions.

6.3 RESULTAT SUPPLEMENTAIRE – INTERACTION PHYSIQUE ENTRE LE MEDiateur ET LES COMPLEXES BAF/PBAF DANS LES CELLULES HUMAINES

Afin de commencer à étudier la conservation de l'interaction physique et fonctionnelle entre le Médiateur et PBAF chez l'homme, j'ai réalisé des expériences de co-immunoprécipitation à partir de cellules HeLa. En fait, les complexes de la famille BAF chez les mammifères sont très similaires car ils partagent un grand nombre de sous-unités, et ne se distinguent que par un faible nombre de sous-unités spécifiques. En effet, ces complexes contiennent entre 10 et 15 sous-unités, et BAF et BAF non canonique possèdent 3 sous-unités qui leurs sont spécifiques, PBAF en possède 4. Pour autant, chacun de ces complexes possède des fonctions spécifiques (Michel et al., 2018). En conséquence, j'ai cherché à détecter une interaction entre le Médiateur et les complexes BAF et BAF non canonique également. Ces expériences montrent que l'immunoprécipitation du Médiateur ou de PBAF, via MED17 et ARID2 respectivement, permet la co-immunoprécipitation de l'autre complexe (figure 16A). De plus, l'immunoprécipitation de BAF via ARID1A permet la co-immunoprécipitation du Médiateur (MED17) (figure 16B), et l'immunoprécipitation du Médiateur via MED17 permet la co-immunoprécipitation de BAF non canonique (GLTSCR1) (figure 16C). En revanche, concernant cette dernière colP, elle doit être répétée car elle n'a été réalisée qu'une fois (n=1). Ensemble, ces résultats montrent que l'interaction physique entre le Médiateur et RSC est conservée chez l'homme, et que l'interaction s'étend avec les autres membres principaux de cette famille de remodeleurs puisque le Médiateur interagit avec BAF et BAF non canonique en plus d'interagir avec PBAF, l'homologue humain de RSC.

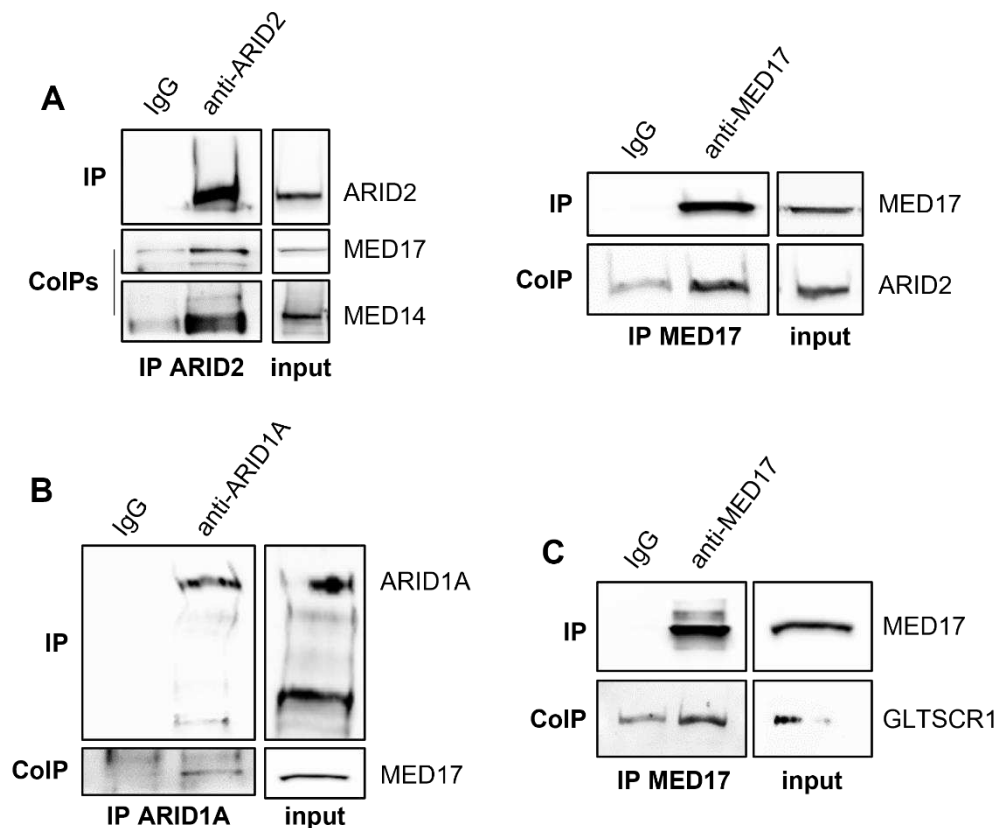


Figure 16. Le Médiateur interagit avec les complexes BAF dans les cellules humaines.

(A) Analyse par western blot de l'interaction entre le Médiateur et PBAF. Les échantillons ont été immunoprécipités avec des anticorps anti-ARID2 ou anti-MED17 (gauche et droite, respectivement). Les immunoprécipitats et les inputs sont analysés par western blot avec des anticorps anti-ARID2, anti-MED17 et anti-MED14. Les co-immunoprécipitations de MED17 et MED14 suite à l'immunoprécipitation d'ARID2 ont été observées 3 ($n=3$) et 2 ($n=2$) fois respectivement (gauche). La co-immunoprécipitation d'ARID2 suite à l'immunoprécipitation de MED17 a été observée 3 fois ($n=3$) (droite). **(B)** Analyse par western blot de l'interaction entre le Médiateur et BAF. Les échantillons ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-ARID1A. Les immunoprécipitats et les inputs sont analysés par western blot avec des anticorps anti-ARID1A et anti-MED17 ($n=2$). **(C)** Analyse par western blot de l'interaction entre le Médiateur et BAF non canonique. Les échantillons ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-MED17. Les immunoprécipitats et les inputs sont analysés par western blot avec des anticorps anti-MED17 et anti-GLTSCR1 ($n=1$). IP : immunoprécipitation. CoIP : co-immunoprécipitation.

Matériel et méthode concernant la colP avec les extraits de cellules humaines.

Les cellules HeLa ont été récupérées mécaniquement à partir des boîtes de culture et lavées avec du PBS (*phosphate-buffered saline*) froid. Elles ont ensuite été lysées de sorte à isoler la fraction nucléoplasmique. Tout d'abord, les membranes cytosoliques ont été lysées pendant 10 minutes à 4°C sur roue rotative dans le tampon hypotonique EB0 (Tris pH 7.5 50 mM, NP-40 0.1%, EDTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM, inhibiteurs de protéases). Les extraits cytosoliques ont été jetés après une étape de centrifugation (2 400 rcf, 5 minutes, 4°C). Les noyaux ont été lavés avec le tampon EB0, et les membranes nucléaires lysées pendant 10 minutes sur route rotative à 4°C dans le tampon salin EB300 (Tris pH 7.5 50 mM, NaCl 300 mM, NP-40 1%, EDTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM, inhibiteurs de protéases). Les extraits nucléaires ont ensuite été récupérés par centrifugation (21 000 rcf, 10 minutes, 4°C). La concentration des protéines fut mesurée par la méthode de Bradford en utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA) comme référence. Les extraits protéiques nucléaires ont été utilisés pour les co-immunoprécipitations de la manière suivante : 50 µl de Dynabeads pan-mouse IgG ou de Dynabeads sheep anti-rabbit sont lavées dans le tampon de lavage de ColP (PBS contenant 0.1 % de BSA et 2 mM d'EDTA) et incubés une heure à température ambiante sur roue rotative dans la même solution. Les billes sont ensuite incubées une heure avec l'anticorps anti-MED17 (PA5-30314, Invitrogen), anti-ARID2 (sc-166117, Santa Cruz) ou anti-ARID1A (sc-373784, Santa Cruz) à température ambiante pendant une heure sur roue rotative. Les billes sont ensuite lavées avec le tampon EB300 et incubées avec 2 mg d'extrait protéique sur la nuit à 4°C, sur roue rotative. Les billes sont ensuite lavées avec le tampon EB300 et resuspendues dans 25 µl de tampon laemmli 2X (Tris-Cl pH 6.8 50 mM, sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.5 %, glycérol 2.5 %, β-mercaptoéthanol 1.25 %, bleu de bromophénol 0.0125 %). Les protéines sont éluées à 95°C pendant 10 minutes et conservées à -80°C.

Avant l'électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide, les échantillons sont incubés à 85°C pendant 5 minutes. La séparation est effectuée sur des gels à 8 % de bis-acrylamide dans du tampon

Tris-Glycine-SDS et les protéines sont transférées sur des membranes Amerham Protran 0.2 μ m (GE healthcare) pour le western blot. Les membranes sont mises dans un bain de PBS supplémenté de 0.05 % de tween 80 (PBS-T) avec 5 % de lait pendant une heure à température ambiante, puis incubées sur la nuit à 4°C avec l'anticorps anti-MED17 (PA5-30314, Invitrogen), anti-ARID2 (sc-166117, Santa Cruz), anti-ARID1A (sc-373784, Santa Cruz), anti-MED14 (ab72141, Abcam) ou anti-GLTSCR1 (sc-515086, Santa Cruz). Après trois lavages dans le PBS-T avec 2% de lait, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires (HRP-anti lapin/souris IgG (H+L), Promega) pendant une heure à température ambiante. Après trois lavages supplémentaires dans le PBS-T, la détection est faite en utilisant les réactifs Amersham ECL-Prime (GE healthcare). Les images sont obtenues avec un système d'imagerie Fusion FX7.

7 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence un lien physique et fonctionnel s'opérant entre le Médiateur de la régulation transcriptionnelle et le remodeleur de la chromatine RSC chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

7.1 INTERACTION PHYSIQUE ENTRE LE MEDIATEUR ET RSC

Nous avons observé que les deux complexes interagissent physiquement chez la levure bourgeonnante à travers l'expérience de ColP, et le système double-hybride nous a permis de mettre en évidence différents contacts physiques entre eux. Nous avons en effet observé 2 contacts principaux : Med17 avec Rsc8 et Med21 avec Rsc3. Un troisième contact entre Med21 et Rsc30 semble exister mais il doit être confirmé. L'utilisation de versions tronquées de Med17 dans le système double-hybride nous a permis d'identifier un fragment minimum requis pour l'interaction avec Rsc8 (le fragment 5, article figure 1B) (figure 17). De même, un fragment de Rsc8 qui contient son domaine SANT a été utilisé dans le système et permet l'interaction avec Med17 (article figure 1) (figure 18). Dans le futur il sera intéressant de préciser l'interaction entre Rsc3 et Med21 en utilisant différents fragments de ces protéines dans le système double-hybride.

Med17 et Med21 sont deux sous-unités essentielles du Médiateur, présentes dans le module de tête et du milieu respectivement, ce qui montre que le Médiateur interagit avec RSC via différents modules. De même, Rsc3 et Rsc30 font partie du module de liaison à l'ADN dans RSC, tandis que Rsc8 est dans le corps du complexe et a un rôle architectural.

Des études structurales d'interaction entre les deux complexes pourront apporter plus d'informations sur la manière dont ils s'orientent et sur les contacts qui s'établissent entre eux.

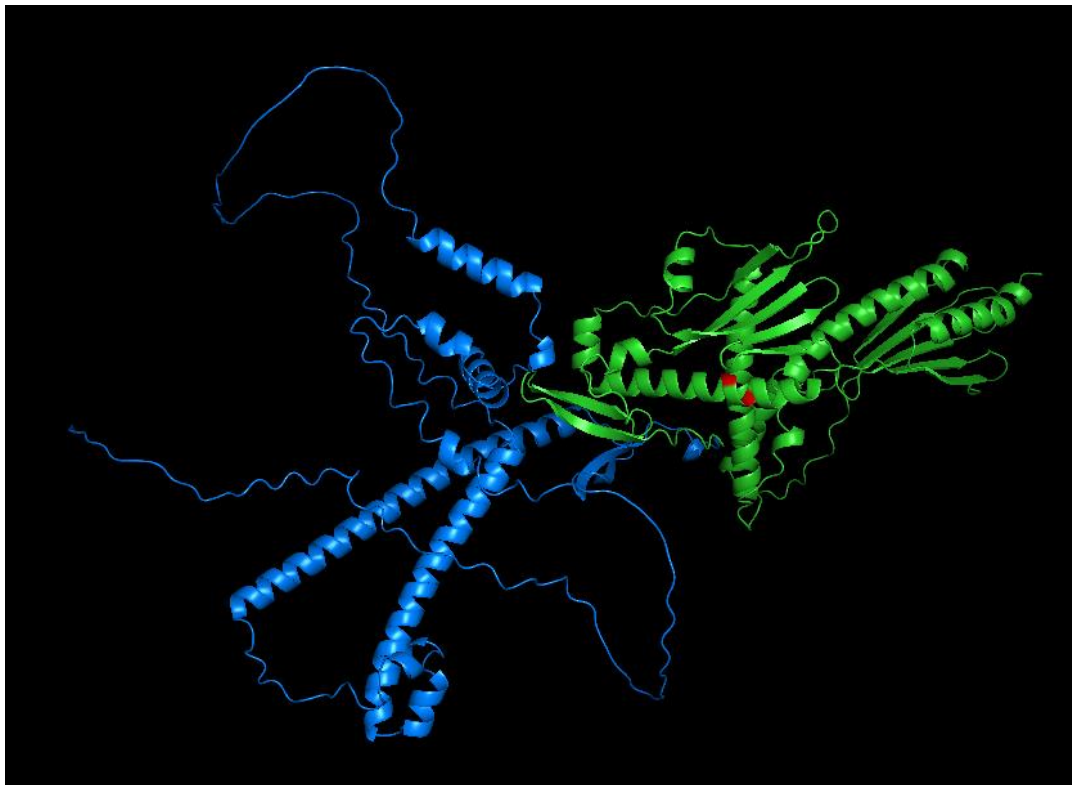


Figure 17. Structure de Med17 chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Pour des raisons de visualisation, la structure de la sous-unité seule, obtenue par AlphaFold, a été choisie pour montrer la localisation des mutations présentes dans la souche med17-140 (M442L et Q444P) (rouge) par rapport au fragment minimum requis pour l'interaction avec Rsc8 dans le système double hybride (vert).

7.2 EFFETS DES MUTATIONS DU MEDIATEUR SUR L'OCCUPATION DES COMPLEXES ET L'ORGANISATION DES PROMOTEURS

Après avoir étudié l'interaction physique entre les deux complexes, nous avons observé qu'ils étaient colocalisés sur le promoteur de certains gènes au niveau des NDR, dans environ 30 % des cas pour les pics de RSC et 77 % pour les pics du Médiateur (article figure 2). De plus, les NDR sur lesquelles ils sont retrouvés en association sont larges en comparaison à celles où on détecte seulement l'un des deux complexes (article figures 2E, 5E, S2E). On

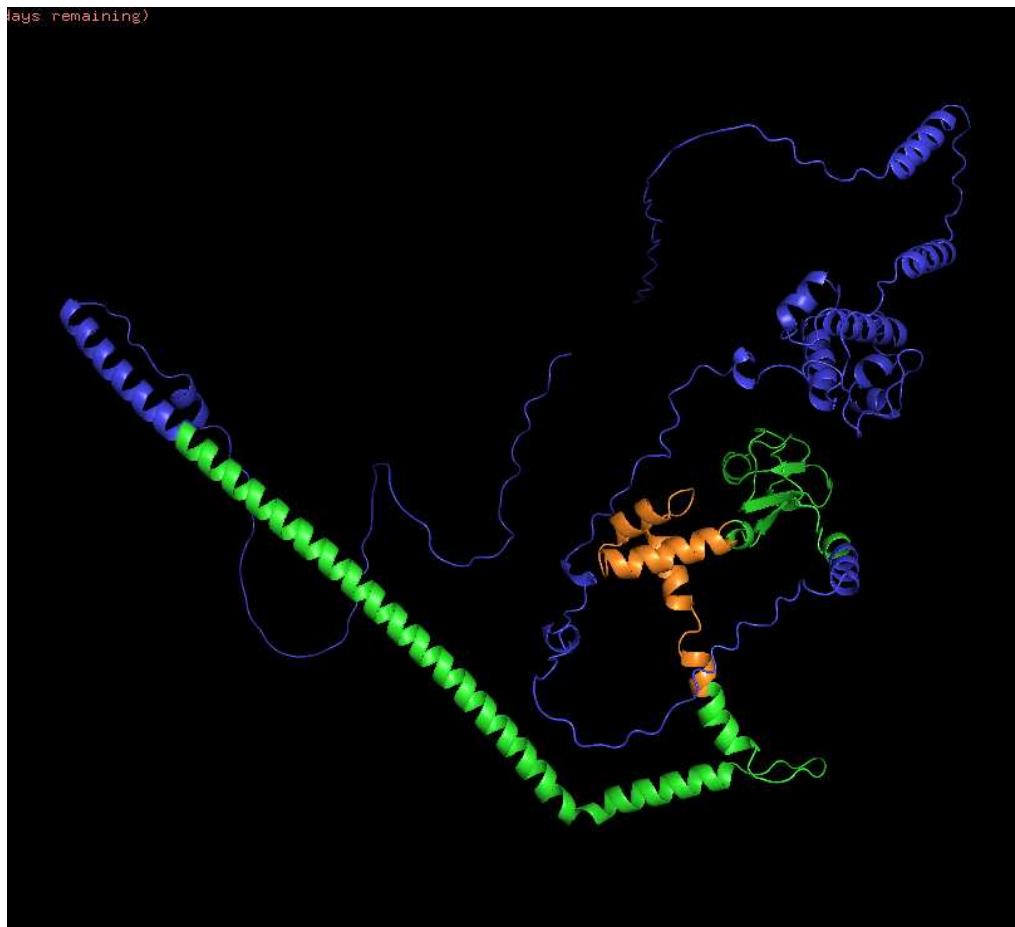


Figure 18. Structure de Rsc8 chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Pour des raisons de visualisation, la structure de la sous-unité seule, obtenue par AlphaFold, a été choisie pour montrer la localisation du domaine SANT (orange) par rapport au fragment qui interagit avec Med17 dans le système double-hybride (vert).

peut dès lors noter que, puisque le Médiateur est essentiel pour la transcription de tous les gènes transcrits par la Pol II (Soutourina et al., 2011), la méthode de ChIP-seq employée durant la thèse ne permet d'observer le complexe que sur des régions où il est stable. Le complexe agit sans doute sur le promoteur des autres gènes, mais probablement d'une manière dynamique qui empêche la détection par ChIP-seq.

Dans le mutant du Médiateur *med17-140*, l'interaction physique entre les deux complexes est plus forte que dans le

contexte sauvage (article figure 4B). De plus, les NDR sur lesquelles se trouvaient le Médiateur et RSC dans une souche sauvage sont désormais remplies par un nucléosome (article figures 4E, S5E, S5F), et Sth1 s'y retrouve stabilisé (article figure 4D). Il est intéressant de noter que cet effet sur le remplissage de la NDR dans le mutant *med17-140* est très fort et localisé en comparaison à ce qui est observé dans les deux mutants de RSC (*sth1-ts* et *rsc8-ts*). En effet, dans les mutants de RSC, on peut observer deux conséquences des mutations sur l'architecture de la chromatine au niveau du promoteur et du gène : on voit dans un premier temps une diminution de la profondeur des NDR ainsi que leur raccourcissement, puis on observe également un décalage du positionnement des nucléosomes se situant dans le gène (article figures 3A, B et C). Il semblerait alors que la mutation *med17-140* affecte principalement l'activité de RSC responsable de l'expulsion d'un nucléosome du promoteur, mais pas celle qui concerne le positionnement des nucléosomes dans le corps du gène. A l'inverse de la mutation *med17-140*, la mutation *med17-444* n'affecte pas l'interaction entre les deux complexes, elle entraîne une stabilisation de Rsc8 mais pas de Sth1 sur les promoteurs et les NDR sont toujours maintenues (article figures 4B, 4D, 4E). De plus, les combinaisons de la mutation *med17-140* avec les mutations de *rsc* sont létales pour les cellules contrairement aux combinaisons avec la mutation *med17-444* (article figure 4A).

D'après ces observations, nous pouvons conclure que le Médiateur et RSC coopèrent lors de l'initiation de la transcription via leur interaction physique. Précisément, le Médiateur semble stimuler l'activité de remodelage de RSC qui concerne l'expulsion d'un nucléosome du promoteur afin de former une NDR, et le positionnement stable du nucléosome +1. Il est probable que cette relation passe par la régulation du contact que RSC établit avec le nucléosome à expulser du promoteur. En effet, dans le mutant *med17-140*, l'interaction entre RSC et le Médiateur est plus forte et Sth1 se retrouve stabilisé sur le nucléosome à expulser. On sait notamment qu'une stabilisation de RSC sur le nucléosome peut inhiber certaines de ces fonctions : le remodeleur ne peut plus expulser le nucléosome qui se retrouve alors stabilisé, mais toutes ses fonctions ne sont pas inhibées puisqu'il est encore capable d'expulser un dimère H2A/H2B (Lorch et al., 2018). Dans notre cas, il semblerait

que la mutation *med17-140* stabilise RSC sur un nucléosome se situant sur la NDR, ce qui empêche son expulsion et donc la création de cette région. Il est intéressant de noter que dans le crible double-hybride, l'interaction entre Med17 et Rsc8 peut être réalisée avec un fragment de Rsc8 qui contient seulement le domaine SANT (acides aminés 248 à 465) (article figure 1B). Ce domaine SANT est observé notamment chez les remodeleurs de la chromatine et permet la liaison aux histones (Boyer et al., 2004). On peut donc supposer que l'interaction entre le Médiateur et RSC intervienne proche du domaine SANT de Rsc8, notamment via Med17, et que le Médiateur régule donc l'interaction RSC-histone. Dans le mutant *med17-140*, l'interaction est modifiée, le domaine peut se trouver dans une conformation différente par rapport à celle qu'il adopte en condition physiologique, l'interaction RSC-nucléosome est alors stabilisée et le nucléosome ne peut pas être expulsé. A l'inverse, dans le mutant *med17-444*, malgré une grande stabilisation de Rsc8 sur le promoteur (article figure 4D), l'interaction entre le Médiateur et RSC n'est pas modifiée (article figure 4B) donc probablement que le domaine SANT de Rsc8 permet une interaction physiologique avec les histones, ce qui permet l'expulsion du nucléosome de la NDR et donc la formation de cette dernière (article figures 4E, 4F, S5F). On peut aussi ajouter qu'on sait que le défaut de création de NDR observé dans le mutant *med17-140* n'est pas une conséquence d'une diminution de la transcription puisqu'il n'est pas observé dans le mutant *med17-444* qui présente la même diminution (article figure S9A).

7.3 DIFFERENCES D'OCCUPATION ENTRE STH1 ET RSC8 DANS LES MUTANTS DU MEDIEUR

Un point qu'il est intéressant de discuter concerne les différences d'occupations de Sth1 et Rsc8 observées dans les mutants. En effet, alors que la mutation *med17-140* entraîne une stabilisation de Sth1 mais pas de Rsc8 sur le promoteur, c'est l'inverse qui se produit avec la mutation *med17-444* (article figure 4D). Ce phénomène était inattendu puisque Sth1 et Rsc8 font partie du

même complexe et ont des fonctions indispensables à son bon fonctionnement. La première remarque vu ces différences d'occupation est qu'on ne peut pas expliquer l'activité de remodelage de RSC sur la NDR seulement par l'occupation de ses sous-unités sur ce même locus. Selon l'hypothèse précédente qui concerne la régulation du contact RSC-histone par le Médiateur, une plus grande occupation de Rsc8 dans le mutant *med17-444* sur le promoteur n'est pas synonyme de stabilisation sur le nucléosome. Cette augmentation de l'occupation de Rsc8 dans ce mutant pourrait correspondre à une interaction plus forte avec l'ADN. Rsc8 contient différents domaines comme le domaine SWIRM, le domaine SANT, le domaine *coiled-coil*, et le domaine *ZZ zinc finger*. Ce dernier est impliqué dans l'interaction avec l'ADN, et les deux copies de Rsc8 au sein de RSC ne l'utilisent pas de la même manière : en effet, il semblerait qu'une seule sous-unité sur les deux soit impliquée dans le contact avec l'ADN nucléosomal (Wagner et al., 2020). En revanche, les trois autres domaines occupent la même fonction au sein du complexe, et donc on peut se demander si une seule copie de Rsc8 peut suffire à rendre RSC fonctionnel. A ma connaissance, rien dans la littérature ne montre que le complexe peut contenir une seule copie de Rsc8, et rien ne montre que Rsc8 puisse lier l'ADN seul, sans être assemblé dans le complexe. On peut alors se demander si dans les mutants du Médiateur le complexe RSC est correctement assemblé, et des altérations de sa composition pourraient expliquer les différences d'occupations observées entre ses différentes sous-unités.

Il est à noter également que des différences d'occupations observées par ChIP-seq peuvent venir de la technique utilisée. En effet, RSC est un grand complexe et Sth1 et Rsc8 n'ont pas la même affinité avec la chromatine. En effet, cette dernière interagit principalement avec Sth1 qui englobe le nucléosome, tandis que Rsc8 est plus une sous-unité architecturale. Les deux sous-unités n'ont pas le même positionnement au sein du complexe par rapport à l'ADN et aux nucléosomes. En conséquence, les efficacités d'immunoprécipitation des deux sous-unités sur la chromatine ne sont pas identiques, puisqu'elles n'interagissent pas de la même manière avec elle.

7.4 NUCLEOSOMES FRAGILES

On sait que RSC lie les nucléosomes dans les NDR larges au niveau des promoteurs, et que ces nucléosomes sont définis comme fragiles car ils perdent des contacts avec l'ADN car ils sont en cours de remodelage (Brahma and Henikoff, 2019). En conséquence, même une faible concentration de MNase entraîne la digestion de l'ADN nucléosomal qui n'est en fait plus protégé par les histones. C'est pourquoi en MNase-seq les nucléosomes fragiles ne peuvent être détectés que par digestion avec des concentrations faibles d'enzyme (Chereji et al., 2019). Dans notre étude il est fort probable qu'avec des digestions plus faibles que celles employées nous aurions pu observer des nucléosomes fragiles dans la NDR des promoteurs dans le contexte sauvage. En effet, en condition physiologique, RSC doit lier ces nucléosomes et les expulser. Ce n'est que dans le mutant *med17-140* que nous pouvons observer ces mêmes nucléosomes (article figures 4, 5) puisqu'ils ne sont plus fragiles. Précisément, cela signifie que l'ADN nucléosomal est de nouveau protégé par les histones. Cela signifie donc que la dynamique d'interaction entre RSC, l'ADN nucléosomal et les histones (introduction figure 14) est modifiée, et que l'ADN interagit désormais davantage avec les histones plutôt qu'avec le remodeleur. RSC est donc probablement lié au nucléosome mais ne permet pas son remodelage.

7.5 NDR LARGES ET GRF

Dans notre étude, le Médiateur et RSC sont ensemble sur les NDR larges et ce sont sur ces régions qu'un nucléosome s'insère dans le mutant *med17-140* (article figures 5E et 5F). Ces NDR larges sont probablement associées à des gènes plus transcrits que les autres, comme le montre le taux d'occupation de la Pol II sur les gènes associés au Médiateur et à RSC (article figure S9A). Une plus grande NDR leur permet d'avoir plus de séquences spécifiques pour des facteurs de régulation, mais permet également l'insertion d'un nucléosome. Des études ont montré que RSC occupe les NDR larges et qu'il coopère avec les GRF Abf1 et Reb1 pour l'expulsion d'un nucléosome. En effet, les NDR larges sont riches en GC et en motifs

polyA qui sont des cibles pour Rsc3 et Rsc30 (Badis et al., 2008; Kubik et al., 2015). RSC permettrait le remodelage du nucléosome dans un premier temps pour dévoiler une séquence de liaison pour les GRF qui pourraient alors s'y lier. A l'inverse, on peut aussi s'attendre à ce que les GRF facilitent le recrutement de RSC. Dans un second temps, le complexe et les GRF pourraient coopérer pour expulser le nucléosome (Brahma and Henikoff, 2019). Il faut noter qu'à ce jour les relations exactes entre RSC et les GRF dans l'organisation de la chromatine restent à préciser. Dans notre étude, nous n'avons pas travaillé avec les GRF Abf1 et Reb1 mais dans le futur, il sera intéressant d'étudier leur occupation sur les promoteurs, notamment sur les NDR larges où sont présents le Médiateur et RSC. Il n'est pas impossible qu'une perte de coopération entre le complexe de remodelage et les GRF soit impliquée dans l'insertion du nucléosome stable sur le promoteur dans *med17-140*.

7.6 RSC ET LE MEDiateur DANS LE POSITIONNEMENT STABLE DU NUCLEOSOME +1

On sait que RSC est impliqué dans le positionnement du nucléosome +1, caractérisé comme étant dynamique avec un renouvellement fréquent (Dion et al., 2007; Krietenstein et al., 2016). D'une manière intéressante, ce nucléosome est déstabilisé dans le mutant *med17-140* : son occupation diminue alors que celle du nucléosome au centre de la NDR augmente et il n'y a pas de changement d'occupation pour les nucléosomes +2 et +3 (article figure 5B). Le Médiateur pourrait alors, à l'instar de SAGA et NuA4, réguler la stabilité du nucléosome +1 en régulant l'interaction que le remodeleur établit avec ce dernier (Lorch et al., 2018). D'autres auteurs ont proposé que le nucléosome fragile que RSC prenait en charge dans le promoteur pour créer la NDR pourrait en fait être le nucléosome +1 avant son positionnement par RSC (Brahma and Henikoff, 2019). Si l'hypothèse était vérifiée, ce ne serait pas une expulsion à proprement parlé mais plutôt une relocalisation, et elle serait ici altérée par la mutation affectant le Médiateur. Des expériences de CUT&RUN (*Cleavage Under Targets & Release Using*

Nuclease) qui ciblent RSC dans le mutant *med17-140* pourraient apporter des éléments de réponse. On pourrait en effet observer sur quel nucléosome se lie RSC.

Précédemment, l'équipe a proposé que certains gènes ont une plus grande dépendance au Médiateur pour l'assemblage du PIC (Eychenne et al., 2016). Ces gènes sont ceux qui présentent une boîte TATA, une faible occupation de nucléosomes au niveau des promoteurs, et des nucléosomes -1 et +1 dynamiques (Eychenne et al., 2016). Il serait intéressant de mettre en relation ces caractéristiques architecturales avec la taille des NDR, car il est fort probable que ces gènes qui dépendent fortement du Médiateur sont aussi ceux au niveau desquels le complexe coopère avec RSC pour créer et maintenir une NDR. De plus, les promoteurs où les nucléosomes sont les plus dynamiques en terme de renouvellement sont associés au Médiateur, aux remodeleurs de la chromatine, et contiennent des sites de liaison spécifiques pour les GRF (Dion et al., 2007).

7.7 LE MÉDIATEUR ET RSC DANS L'ORGANISATION TRIDIMENSIONNELLE DU GÉNOME

Les expériences menées durant ce travail de thèse suggèrent fortement que le Médiateur régule l'architecture de la chromatine sur le promoteur des gènes via RSC. On peut se demander désormais s'il peut être impliqué dans ce type de régulation à une échelle plus globale dans le noyau. En effet, une délétion de *Med1* entraîne une décompaction générale du génome (Hsieh et al., 2015). De plus, le Médiateur est retrouvé en association avec des protéines ou des complexes jouant un rôle dans l'organisation du génome à des endroits spécifiques du noyau. Par exemple, il est retrouvé en association avec des remodeleurs et des protéines spécifiques des frontières des CID au niveau de ces mêmes frontières (Chereji et al., 2017). Il interagit aussi avec TREX2 au niveau des pores nucléaires (Schneider et al., 2015), avec la cohésine pour former des boucles d'ADN (Kagey et al., 2010), et avec plusieurs autres protéines impliquées dans l'architecture de la chromatine tels que des

modificateurs et des remodeleurs (Quevedo et al., 2019). Des expériences utilisant la technique de Micro-C (*micrococcal nuclease chromosome conformation assay*) pourraient apporter des éléments de réponse concernant l'effet des mutations du Médiateur sur l'architecture globale du génome.

On peut ajouter qu'il est très probable que le Médiateur établisse d'autres liens fonctionnels avec d'autres remodeleurs que RSC. Comme dit précédemment, non seulement il est retrouvé en association avec nombre d'entre eux sur des régions spécifiques, mais en plus, lors du crible du laboratoire réalisé dans les années 2000, des interactions physiques avec certaines sous-unités d'autres complexes ont été observées (données non publiées). De prochaines études permettront de dévoiler la fonction de ces interactions.

7.8 FONCTIONS AU-DELA DE L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION

On peut aussi se demander dans quel contexte et à quel moment interviennent les interactions entre les sous-unités des deux complexes. En effet, bien qu'on ait pu montrer à travers l'article que RSC et le Médiateur sont impliqués dans l'initiation de la transcription, on sait que ces deux complexes sont aussi impliqués dans les événements post-initiation ainsi que dans d'autres événements liés à l'ADN comme la réparation par exemple. En effet, le Médiateur a déjà été impliqué dans des voies de réparation dans lesquelles RSC est aussi impliqué comme la NER (Georges et al., 2019; Srivas et al., 2013). On peut alors supposer que ces complexes coopèrent dans d'autres contextes, et que les interactions qu'ils établissent peuvent varier en fonction de ces contextes. On peut tout de même supposer que les contacts qui s'établissent via Rsc3 et Rsc30 prennent place dans l'initiation de la transcription puisque ces sous-unités permettent la reconnaissance de motifs spécifiques dans la NDR des promoteurs (Angus-Hill et al., 2001). On peut penser au rôle similaire des contacts qui s'établissent via Rsc8 puisque des mutations de cette sous-unité impactent la maintenance des NDR ainsi que la position des nucléosomes présents dans le corps des gènes (article figures 3A, 3B).

7.9 CONSERVATION DANS LES CELLULES HUMAINES

Durant la thèse, j'ai aussi commencé à étudier une potentielle conservation de l'interaction entre le Médiateur et RSC chez l'homme. Il est très intéressant de constater que le Médiateur n'interagit pas seulement avec l'homologue humain de RSC (PBAF) mais aussi avec les deux autres membres principaux de la famille BAF : BAF et BAF non canonique (BAFnc). Dans le futur, il sera intéressant de préciser quelles sous-unités sont impliquées dans cette interaction dans un système double-hybride. Il est possible qu'elle se fasse, au moins en partie, via MED17 et SMARCC1, l'homologue humain de Rsc8, commun aux trois complexes de la famille. La prochaine étape est de déterminer le rôle de ces interactions, et de déterminer si le Médiateur régule une activité commune aux trois complexes ou des activités plus spécifiques. Il est possible que le Médiateur régule l'activité de remodelage des complexes, au moins partiellement comme chez la levure. En revanche, une fonction essentielle des complexes BAF absente chez la levure est l'antagonisme des complexes Polycomb (PRC). Il est intéressant de noter qu'on sait déjà que le Médiateur interagit avec les PRC et qu'ils co-occupent certains promoteurs où ils coopèrent dans certains contextes cellulaires (dans une lignée de carcinome embryonnaire et dans des cellules souches embryonnaires murines) (Fukasawa et al., 2015; Morey, 2016; Papadopoulou et al., 2016). Dans ces cas, on pourrait alors s'attendre à ce que le Médiateur inhibe la fonction des complexes BAF qui consiste à expulser les PRC de la chromatine. Il est possible que les régulations et les coopérations soient différentes dans d'autres contextes cellulaires. Comprendre la relation qui s'opère entre ces régulateurs nous permettra également de mieux comprendre les nombreuses maladies dans lesquelles ils sont impliqués comme le cancer, et peut-être à terme d'utiliser ces connaissances pour améliorer la prise en charge clinique des patients.

7.10 CONCLUSION GENERALE

En résumé, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence un lien physique et fonctionnel entre le Médiateur de la régulation

transcriptionnelle et le remodeleur de la chromatine RSC chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* au niveau des promoteurs pourvus d'une NDR large. Le Médiateur stimule au moins une des activités de remodelage de RSC qui consiste à expulser un nucléosome du promoteur pour créer une NDR. A l'heure actuelle, on ne peut pas exclure que cette activité soit la même qui consiste à positionner de façon stable le nucléosome +1. Alternativement, le Médiateur peut être impliqué dans une seconde régulation qui concerne ce positionnement. De plus, le Médiateur interagit avec les complexes de la famille BAF dans les cellules humaines.

Ce travail permet d'ouvrir la voie à de nombreuses études. Dans le futur, il sera très intéressant de préciser de quelle manière le Médiateur et RSC interagissent, déjà dans l'initiation de la transcription, mais aussi d'investiguer s'ils coopèrent dans d'autres mécanismes nucléaires. Il sera également très intéressant de déterminer le rôle des interactions que le Médiateur établit avec d'autres remodeleurs, et de déterminer son rôle dans l'organisation globale de la chromatine. De plus, dans les cellules humaines, le rôle fonctionnel des trois interactions observées doit être étudié, notamment dans les nombreux contextes pathologiques où les deux complexes sont impliqués.

8 RÉFÉRENCES

Akhtar, A., and Becker, P.B. (2000). Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol Cell* 5, 367–375. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80431-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80431-1).

Albert, I., Mavrich, T.N., Tomsho, L.P., Qi, J., Zanton, S.J., Schuster, S.C., and Pugh, B.F. (2007). Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 446, 572–576. <https://doi.org/10.1038/nature05632>.

Alfert, A., Moreno, N., and Kerl, K. (2019). The BAF complex in development and disease. *Epigenetics Chromatin* 12, 19. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0264-y>.

Amati, B., and Land, H. (1994). Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* 4, 102–108. [https://doi.org/10.1016/0959-437x\(94\)90098-1](https://doi.org/10.1016/0959-437x(94)90098-1).

André, K.M., Sipos, E.H., and Soutourina, J. (2021). Mediator Roles Going Beyond Transcription. *Trends Genet* 37, 224–234. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.08.015>.

Angus-Hill, M.L., Schlichter, A., Roberts, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Cairns, B.R. (2001). A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Mol. Cell* 7, 741–751. .

Ansari, S.A., Paul, E., Sommer, S., Lieleg, C., He, Q., Daly, A.Z., Rode, K.A., Barber, W.T., Ellis, L.C., LaPorta, E., et al. (2014). Mediator, TATA-binding Protein, and RNA Polymerase II Contribute to Low Histone Occupancy at Active Gene Promoters in Yeast. *J Biol Chem* 289, 14981–14995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.529354>.

Archambault, J., Lacroute, F., Ruet, A., and Friesen, J.D. (1992). Genetic interaction between transcription elongation factor TFIIS and RNA polymerase II. *Molecular and Cellular Biology* 12, 4142–4152.

<https://doi.org/10.1128/mcb.12.9.4142-4152.1992>.

Badis, G., Chan, E.T., van Bakel, H., Pena-Castillo, L., Tillo, D., Tsui, K., Carlson, C.D., Gossett, A.J., Hasinoff, M.J., Warren, C.L., et al. (2008). A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Mol Cell* 32, 878–887. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.020>.

Baek, I., Friedman, L.J., Gelles, J., and Buratowski, S. (2021). Single-molecule studies reveal branched pathways for activator-dependent assembly of RNA polymerase II pre-initiation complexes. *Mol Cell* 81, 3576–3588.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.07.025>.

Baidooobonso, S.M., Guidi, B.W., and Myers, L.C. (2007). Med19(Rox3) regulates Intermodule interactions in the *Saccharomyces cerevisiae* mediator complex. *J Biol Chem* 282, 5551–5559. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609484200>.

Baker, R.W., Reimer, J.M., Carman, P.J., Turegun, B., Arakawa, T., Dominguez, R., and Leschziner, A.E. (2021). Structural insights into assembly and function of the RSC chromatin remodeling complex. *Nat Struct Mol Biol* 28, 71–80. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00528-8>.

Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., and Rosen, M.K. (2017). Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 285–298. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7>.

Baptista, T., Grünberg, S., Minoungou, N., Koster, M.J., Timmers, H.M., Hahn, S., Devys, D., and Tora, L. (2017). SAGA is a general cofactor for RNA polymerase II transcription. *Mol Cell* 68, 130–143.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.016>.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>.

Basehoar, A.D., Zanton, S.J., and Pugh, B.F. (2004). Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* 116,

699–709. .

Berroteran, R.W., Ware, D.E., and Hampsey, M. (1994). The sua8 suppressors of *Saccharomyces cerevisiae* encode replacements of conserved residues within the largest subunit of RNA polymerase II and affect transcription start site selection similarly to sua7 (TFIIB) mutations. *Molecular and Cellular Biology* 14, 226–237. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.1.226-237.1994>.

Bhaumik, S.R., and Green, M.R. (2002). Differential requirement of SAGA components for recruitment of TATA-box-binding protein to promoters in vivo. *Mol Cell Biol* 22, 7365–7371. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.21.7365-7371.2002>.

Biankin, A.V., Waddell, N., Kassahn, K.S., Gingras, M.-C., Muthuswamy, L.B., Johns, A.L., Miller, D.K., Wilson, P.J., Patch, A.-M., Wu, J., et al. (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 491, 399–405. <https://doi.org/10.1038/nature11547>.

Biernat, E., Kinney, J., Dunlap, K., Rizza, C., and Govind, C.K. (2021). The RSC complex remodels nucleosomes in transcribed coding sequences and promotes transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 217. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab021>.

Boehning, M., Dugast-Darzacq, C., Rankovic, M., Hansen, A.S., Yu, T., Marie-Nelly, H., McSwiggen, D.T., Kokic, G., Dailey, G.M., Cramer, P., et al. (2018). RNA polymerase II clustering through carboxy-terminal domain phase separation. *Nat Struct Mol Biol* 25, 833–840. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0112-y>.

Boeing, S., Rigault, C., Heidemann, M., Eick, D., and Meisterernst, M. (2010). RNA polymerase II C-terminal heptarepeat domain Ser-7 phosphorylation is established in a mediator-dependent fashion. *J Biol Chem* 285, 188–196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.046565>.

Boeing, S., Williamson, L., Encheva, V., Gori, I., Saunders, R.E., Instrell, R., Aygün, O., Rodriguez-Martinez, M., Weems, J.C., Kelly, G.P., et al. (2016). Multiomic Analysis of the UV-Induced DNA Damage Response. *Cell Rep* 15, 1597–1610.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.047>.

Boija, A., Klein, I.A., Sabari, B.R., Dall'Agnese, A., Coffey, E.L., Zamudio, A.V., Li, C.H., Shrinivas, K., Manteiga, J.C., Hannett, N.M., et al. (2018). Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains. *Cell* 175, 1842–1855.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.042>.

Bondarenko, V.A., Steele, L.M., Ujvári, A., Gaykalova, D.A., Kulaeva, O.I., Polikanov, Y.S., Luse, D.S., and Studitsky, V.M. (2006). Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* 24, 469–479. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.09.009>.

Bourbon, H.-M. (2008). Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex. *Nucleic Acids Res* 36, 3993–4008. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn349>.

Bowman, G.D. (2010). Mechanisms of ATP-Dependent Nucleosome Sliding. *Curr Opin Struct Biol* 20, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.12.002>.

Boyer, L.A., Latek, R.R., and Peterson, C.L. (2004). The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 158–163. <https://doi.org/10.1038/nrm1314>.

Boyer, T.G., Martin, M.E., Lees, E., Ricciardi, R.P., and Berk, A.J. (1999). Mammalian Srb/Mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. *Nature* 399, 276–279. <https://doi.org/10.1038/20466>.

Brahma, S., and Henikoff, S. (2019). RSC-Associated Subnucleosomes Define MNase-Sensitive Promoters in Yeast. *Molecular Cell* 73, 238–249.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.046>.

Brandl, C.J., and Struhl, K. (1989). Yeast GCN4 transcriptional activator protein interacts with RNA polymerase II in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2652–2656. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2652>.

Brannan, K., Kim, H., Erickson, B., Glover-Cutter, K., Kim, S., Fong, N., Kiemele, L., Hansen, K., Davis, R., Lykke-Andersen, J., et al. (2012).

mRNA decapping factors and the exonuclease Xrn2 function in widespread premature termination of RNA polymerase II transcription. *Mol Cell* 46, 311–324. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.03.006>.

Brien, G.L., Remillard, D., Shi, J., Hemming, M.L., Chabon, J., Wynne, K., Dillon, E.T., Cagney, G., Van Mierlo, G., Baltissen, M.P., et al. (2018). Targeted degradation of BRD9 reverses oncogenic gene expression in synovial sarcoma. *ELife* 7, e41305. <https://doi.org/10.7554/eLife.41305>.

Buchman, A.R., and Kornberg, R.D. (1990). A yeast ARS-binding protein activates transcription synergistically in combination with other weak activating factors. *Mol Cell Biol* 10, 887–897. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.3.887-897.1990>.

Cai, G., Imasaki, T., Takagi, Y., and Asturias, F.J. (2009). Mediator Structural Conservation and Implications for the Regulation Mechanism. *Structure* 17, 559–567. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.01.016>.

Cairns, B.R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B., and Kornberg, R.D. (1996). RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* 87, 1249–1260. .

Cairns, B.R., Schlichter, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Kornberg, R.D., and Winston, F. (1999). Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains. *Mol Cell* 4, 715–723. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80382-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80382-2).

Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth, C., Schultz, N., Cherniack, A.D., Akbani, R., Liu, Y., Shen, H., Robertson, A.G., Pashtan, I., Shen, R., et al. (2013). Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497, 67–73. <https://doi.org/10.1038/nature12113>.

Cao, R., and Zhang, Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* 14, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.02.001>.

Cao, Y., Cairns, B.R., Kornberg, R.D., and Laurent, B.C. (1997). Sfh1p, a component of a novel chromatin-remodeling complex, is required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 17, 3323–3334. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.6.3323>.

Caro-Llopis, A., Rosello, M., Orellana, C., Oltra, S., Monfort, S., Mayo, S., and Martinez, F. (2016). De novo mutations in genes of mediator complex causing syndromic intellectual disability: mediatoropathy or transcriptomopathy? *Pediatr Res* 80, 809–815. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.162>.

Cevher, M.A., Shi, Y., Li, D., Chait, B.T., Malik, S., and Roeder, R.G. (2014). Reconstitution of active human core Mediator complex reveals a pivotal role of the MED14 subunit. *Nat Struct Mol Biol* 21, 1028–1034. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2914>.

Chai, B., Huang, J., Cairns, B.R., and Laurent, B.C. (2005). Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes Dev* 19, 1656–1661. <https://doi.org/10.1101/gad.1273105>.

Chambers, A.L., Brownlee, P.M., Durley, S.C., Beacham, T., Kent, N.A., and Downs, J.A. (2012). The two different isoforms of the RSC chromatin remodeling complex play distinct roles in DNA damage responses. *PLoS One* 7, e32016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032016>.

Chang, Y.-W., Howard, S.C., and Herman, P.K. (2004). The Ras/PKA signaling pathway directly targets the Srb9 protein, a component of the general RNA polymerase II transcription apparatus. *Mol Cell* 15, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.021>.

Chen, H.-T., and Hahn, S. (2003). Binding of TFIIB to RNA polymerase II: Mapping the binding site for the TFIIB zinc ribbon domain within the preinitiation complex. *Mol Cell* 12, 437–447. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00306-x](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00306-x).

Chereji, R.V., Bharatula, V., Elfving, N., Blomberg, J., Larsson, M., Morozov, A.V., Broach, J.R., and Björklund, S. (2017). Mediator binds to boundaries of chromosomal interaction domains and to proteins

involved in DNA looping, RNA metabolism, chromatin remodeling, and actin assembly. *Nucleic Acids Res* 45, 8806–8821. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx491>.

Chereji, R.V., Bryson, T.D., and Henikoff, S. (2019). Quantitative MNase-seq accurately maps nucleosome occupancy levels. *Genome Biology* 20, 198. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1815-z>.

Chesi, A., Staahl, B.T., Jovičić, A., Couthouis, J., Fasolino, M., Raphael, A.R., Yamazaki, T., Elias, L., Polak, M., Kelly, C., et al. (2013). Exome sequencing to identify de novo mutations in sporadic ALS trios. *Nat Neurosci* 16, 851–855. <https://doi.org/10.1038/nn.3412>.

Cho, E.-J., and Buratowski, S. (1999). Evidence That Transcription Factor IIB Is Required for a Post-assembly Step in Transcription Initiation*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 25807–25813. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25807>.

Cho, W.-K., Spille, J.-H., Hecht, M., Lee, C., Li, C., Grube, V., and Cisse, I.I. (2018). Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates. *Science* 361, 412–415. <https://doi.org/10.1126/science.aar4199>.

Chong, S., Dugast-Darzacq, C., Liu, Z., Dong, P., Dailey, G.M., Cattoglio, C., Heckert, A., Banala, S., Lavis, L., Darzacq, X., et al. (2018). Imaging dynamic and selective low-complexity domain interactions that control gene transcription. *Science* 361, eaar2555. <https://doi.org/10.1126/science.aar2555>.

Churchman, L.S., and Weissman, J.S. (2011). Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature* 469, 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature09652>.

Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 273–304. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223>.

Clapier, C.R., Iwasa, J., Cairns, B.R., and Peterson, C.L. (2017). Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 407–422.

<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.26>.

Clark, J., Rocques, P.J., Crew, A.J., Gill, S., Shipley, J., Chan, A.M., Gusterson, B.A., and Cooper, C.S. (1994). Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat Genet* 7, 502–508. <https://doi.org/10.1038/ng0894-502>.

Cohen, I., Bar, C., and Ezhkova, E. (2020). Activity of PRC1 and histone H2AK119 monoubiquitination: Revising popular misconceptions. *Bioessays* 42, e1900192. <https://doi.org/10.1002/bies.201900192>.

Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2013). The Mediator Complex and Transcription Elongation. *Biochim Biophys Acta* 1829, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbagra.2012.08.017>.

Core, L., and Adelman, K. (2019). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: a nexus of gene regulation. *Genes Dev* 33, 960–982. <https://doi.org/10.1101/gad.325142.119>.

Cortazar, M.A., Sheridan, R.M., Erickson, B., Fong, N., Glover-Cutter, K., Brannan, K., and Bentley, D.L. (2019). Control of RNA Pol II Speed by PNUITS-PP1 and Spt5 Dephosphorylation Facilitates Termination by a “Sitting Duck Torpedo” Mechanism. *Mol Cell* 76, 896–908.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.031>.

Cramer, P. (2019). Organization and regulation of gene transcription. *Nature* 573, 45–54. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1517-4>.

Creyghton, M.P., Cheng, A.W., Welstead, G.G., Kooistra, T., Carey, B.W., Steine, E.J., Hanna, J., Lodato, M.A., Frampton, G.M., Sharp, P.A., et al. (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 21931–21936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016071107>.

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

573. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00475-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00475-6).

Davidson, L., Kerr, A., and West, S. (2012). Co-transcriptional degradation of aberrant pre-mRNA by Xrn2. *EMBO J* 31, 2566–2578. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.101>.

Deng, W., and Roberts, S.G.E. (2005). A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. *Genes Dev* 19, 2418–2423. <https://doi.org/10.1101/gad.342405>.

de Dieuleveult, M., Yen, K., Hmitou, I., Depaux, A., Boussouar, F., Dargham, D.B., Jounier, S., Humbertclaude, H., Ribierre, F., Baulard, C., et al. (2016). Genome-wide nucleosome specificity and function of chromatin remodellers in ES cells. *Nature* 530, 113–116. <https://doi.org/10.1038/nature16505>.

Dion, M.F., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Friedman, N., and Rando, O.J. (2007). Dynamics of replication-independent histone turnover in budding yeast. *Science* 315, 1405–1408. <https://doi.org/10.1126/science.1134053>.

Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485, 376–380. <https://doi.org/10.1038/nature11082>.

Dollinger, R., and Gilmour, D.S. (2021). Regulation of Promoter Proximal Pausing of RNA Polymerase II in Metazoans. *Journal of Molecular Biology* 433, 166897. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166897>.

Donner, A.J., Ebmeier, C.C., Taatjes, D.J., and Espinosa, J.M. (2010). CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 194–201. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1752>.

Douillet, D., Sze, C.C., Ryan, C., Piunti, A., Shah, A.P., Ugarenko, M., Marshall, S.A., Rendleman, E.J., Zha, D., Helmin, K.A., et al. (2020). Uncoupling histone H3K4 trimethylation from developmental gene expression via an equilibrium of COMPASS, Polycomb and DNA

methylation. *Nat Genet* 52, 615–625. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0618-1>.

Duttke, S.H.C. (2015). Evolution and Diversification of the Basal Transcription Machinery. *Trends Biochem Sci* 40, 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.01.005>.

Eaton, J.D., and West, S. (2020). Termination of Transcription by RNA Polymerase II: BOOM! *Trends Genet* 36, 664–675. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.05.008>.

Eaton, J.D., Francis, L., Davidson, L., and West, S. (2020). A unified allosteric/torpedo mechanism for transcriptional termination on human protein-coding genes. *Genes Dev* 34, 132–145. <https://doi.org/10.1101/gad.332833.119>.

Edwards, A.M., Kane, C.M., Young, R.A., and Kornberg, R.D. (1991). Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. *J. Biol. Chem.* 266, 71–75. .

Eichner, J., Chen, H.-T., Warfield, L., and Hahn, S. (2010). Position of the general transcription factor TFIIF within the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *EMBO J* 29, 706–716. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.386>.

El Khattabi, L., Zhao, H., Kalchschmidt, J., Young, N., Jung, S., Van Blerkom, P., Kieffer-Kwon, P., Kieffer-Kwon, K.-R., Park, S., Wang, X., et al. (2019). A Pliable Mediator Acts as a Functional Rather Than an Architectural Bridge between Promoters and Enhancers. *Cell* 178, 1145–1158.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.011>.

Elemento, O., and Tavazoie, S. (2005). Fast and systematic genome-wide discovery of conserved regulatory elements using a non-alignment based approach. *Genome Biology* 6, R18. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-2-r18>.

Elrod, N.D., Henriques, T., Huang, K.-L., Tatomer, D.C., Wilusz, J.E., Wagner, E.J., and Adelman, K. (2019). The Integrator Complex Attenuates Promoter-Proximal Transcription at Protein-Coding Genes.

Mol Cell 76, 738–752.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.034>.

Esnault, C., Ghavi-Helm, Y., Brun, S., Soutourina, J., Van Berkum, N., Boschiero, C., Holstege, F., and Werner, M. (2008). Mediator-dependent recruitment of TFIID modules in preinitiation complex. *Mol. Cell* 31, 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.021>.

Eyboulet, F., Cibot, C., Eychenne, T., Neil, H., Alibert, O., Werner, M., and Soutourina, J. (2013). Mediator links transcription and DNA repair by facilitating Rad2/XPG recruitment. *Genes Dev* 27, 2549–2562. <https://doi.org/10.1101/gad.225813.113>.

Eyboulet, F., Wydau-Dematteis, S., Eychenne, T., Alibert, O., Neil, H., Boschiero, C., Nevers, M.-C., Volland, H., Cornu, D., Redeker, V., et al. (2015). Mediator independently orchestrates multiple steps of preinitiation complex assembly in vivo. *Nucleic Acids Res.* 43, 9214–9231. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv782>.

Eychenne, T., Novikova, E., Barrault, M.-B., Alibert, O., Boschiero, C., Peixeiro, N., Cornu, D., Redeker, V., Kuras, L., Nicolas, P., et al. (2016). Functional interplay between Mediator and TFIID in preinitiation complex assembly in relation to promoter architecture. *Genes Dev.* 30, 2119–2132. <https://doi.org/10.1101/gad.285775.116>.

Falender, A.E., Freiman, R.N., Geles, K.G., Lo, K.C., Hwang, K., Lamb, D.J., Morris, P.L., Tjian, R., and Richards, J.S. (2005). Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev* 19, 794–803. <https://doi.org/10.1101/gad.1290105>.

Fenouil, R., Cauchy, P., Koch, F., Descostes, N., Cabeza, J.Z., Innocenti, C., Ferrier, P., Spicuglia, S., Gut, M., Gut, I., et al. (2012). CpG islands and GC content dictate nucleosome depletion in a transcription-independent manner at mammalian promoters. *Genome Res* 22, 2399–2408. <https://doi.org/10.1101/gr.138776.112>.

Fioravanti, R., Stazi, G., Zwergel, C., Valente, S., and Mai, A. (2018). Six Years (2012–2018) of Researches on Catalytic EZH2 Inhibitors: The Boom of the 2-Pyridone Compounds. *Chem Rec* 18, 1818–1832. <https://doi.org/10.1002/tcr.201800091>.

Flanagan, P.M., Kelleher, R.J., Sayre, M.H., Tschochner, H., and Kornberg, R.D. (1991). A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature* 350, 436–438. <https://doi.org/10.1038/350436a0>.

Floer, M., Wang, X., Prabhu, V., Berrozpe, G., Narayan, S., Spagna, D., Alvarez, D., Kendall, J., Krasnitz, A., Stepansky, A., et al. (2010). A RSC/nucleosome complex determines chromatin architecture and facilitates activator binding. *Cell* 141, 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.048>.

Fourel, G., Miyake, T., Defossez, P.-A., Li, R., and Gilson, E. (2002). General regulatory factors (GRFs) as genome partitioners. *J Biol Chem* 277, 41736–41743. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202578200>.

Fujinaga, K., Irwin, D., Huang, Y., Taube, R., Kurosu, T., and Peterlin, B.M. (2004). Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Mol Cell Biol* 24, 787–795. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.2.787-795.2004>.

Fukasawa, R., Iida, S., Tsutsui, T., Hirose, Y., and Ohkuma, Y. (2015). Mediator complex cooperatively regulates transcription of retinoic acid target genes with Polycomb Repressive Complex 2 during neuronal differentiation. *J Biochem* 158, 373–384. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv055>.

Gatchalian, J., Malik, S., Ho, J., Lee, D.-S., Kelso, T.W.R., Shokhirev, M.N., Dixon, J.R., and Hargreaves, D.C. (2018). A non-canonical BRD9-containing BAF chromatin remodeling complex regulates naive pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Commun* 9, 5139. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07528-9>.

Gates, L.A., Shi, J., Rohira, A.D., Feng, Q., Zhu, B., Bedford, M.T., Sagum, C.A., Jung, S.Y., Qin, J., Tsai, M.-J., et al. (2017). Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation. *J Biol Chem* 292, 14456–14472. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.802074>.

Georges, A., Gopaul, D., Denby Wilkes, C., Giordanengo Aiach, N.,

Novikova, E., Barrault, M.-B., Alibert, O., and Soutourina, J. (2019). Functional interplay between Mediator and RNA polymerase II in Rad2/XPG loading to the chromatin. *Nucleic Acids Res.* *47*, 8988–9004. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz598>.

Ghavi-Helm, Y., Jankowski, A., Meiers, S., Viales, R.R., Korb, J.O., and Furlong, E.E.M. (2019). Highly rearranged chromosomes reveal uncoupling between genome topology and gene expression. *Nat Genet* *51*, 1272–1282. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0462-3>.

Gibert, J.-M., and Karch, F. (2011). The Polycomb group protein CRAMPED is involved with TRF2 in the activation of the histone H1 gene. *Chromosoma* *120*, 297–307. <https://doi.org/10.1007/s00412-011-0312-2>.

Gilchrist, D.A., Dos Santos, G., Fargo, D.C., Xie, B., Gao, Y., Li, L., and Adelman, K. (2010). Pausing of RNA polymerase II disrupts DNA-specified nucleosome organization to enable precise gene regulation. *Cell* *143*, 540–551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.004>.

Ginsburg, D.S., Govind, C.K., and Hinnebusch, A.G. (2009). NuA4 Lysine Acetyltransferase Esa1 Is Targeted to Coding Regions and Stimulates Transcription Elongation with Gcn5. *Mol Cell Biol* *29*, 6473–6487. <https://doi.org/10.1128/MCB.01033-09>.

Goodrich, J.A., and Tjian, R. (2010). Unexpected roles for core promoter recognition factors in cell-type-specific transcription and gene regulation. *Nat Rev Genet* *11*, 549–558. <https://doi.org/10.1038/nrg2847>.

Goodrich, J.A., Cutler, G., and Tjian, R. (1996). Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell* *84*, 825–830. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81061-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81061-2).

Gopaul, D., Denby Wilkes, C., Goldar, A., Giordanengo Aiach, N., Barrault, M.-B., Novikova, E., and Soutourina, J. (2022). Genomic analysis of Rad26 and Rad1-Rad10 reveals differences in their dependence on Mediator and RNA polymerase II. *Genome Res* *gr.276371.121*. <https://doi.org/10.1101/gr.276371.121>.

Govind, C.K., Yoon, S., Qiu, H., Govind, S., and Hinnebusch, A.G. (2005). Simultaneous recruitment of coactivators by Gcn4p stimulates multiple steps of transcription in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5626–5638. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.13.5626-5638.2005>.

Graham, J.M., and Schwartz, C.E. (2013). MED12 Related Disorders. *Am J Med Genet A* 161, 10.1002/ajmg.a.36183. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36183>.

Gregersen, L.H., Mitter, R., Ugalde, A.P., Nojima, T., Proudfoot, N.J., Agami, R., Stewart, A., and Svejstrup, J.Q. (2019). SCAF4 and SCAF8, mRNA Anti-Terminator Proteins. *Cell* 177, 1797-1813.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.038>.

Grewal, S.I.S., and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8, 35–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2008>.

Grive, K.J., Seymour, K.A., Mehta, R., and Freiman, R.N. (2014). TAF4b promotes mouse primordial follicle assembly and oocyte survival. *Dev Biol* 392, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.05.001>.

Guermah, M., Ge, K., Chiang, C.M., and Roeder, R.G. (2003). The TBN protein, which is essential for early embryonic mouse development, is an inducible TAFII implicated in adipogenesis. *Mol Cell* 12, 991–1001. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00396-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00396-4).

Gulati, N., Béguelin, W., and Giulino-Roth, L. (2018). Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) inhibitors. *Leuk Lymphoma* 59, 1574–1585. <https://doi.org/10.1080/10428194.2018.1430795>.

Guo, Y.E., Manteiga, J.C., Henninger, J.E., Sabari, B.R., Dall’Agnese, A., Hannett, N.M., Spille, J.-H., Afeyan, L.K., Zamudio, A.V., Shrinivas, K., et al. (2019). Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates. *Nature* 572, 543–548. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1464-0>.

Gwack, Y., Baek, H.J., Nakamura, H., Lee, S.H., Meisterernst, M., Roeder, R.G., and Jung, J.U. (2003). Principal role of TRAP/mediator and SWI/SNF complexes in Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus RTA-mediated lytic reactivation. *Mol Cell Biol* 23, 2055–2067.

<https://doi.org/10.1128/MCB.23.6.2055-2067.2003>.

Han, M., and Grunstein, M. (1988). Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell* 55, 1137–1145. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90258-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90258-9).

Hartley, P.D., and Madhani, H.D. (2009). Mechanisms that specify promoter nucleosome location and identity. *Cell* 137, 445–458. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.043>.

Hawley, D.K., and Roeder, R.G. (1987). Functional steps in transcription initiation and reinitiation from the major late promoter in a HeLa nuclear extract. *J Biol Chem* 262, 3452–3461. .

Héberlé, É., and Bardet, A.F. (2019). Sensitivity of transcription factors to DNA methylation. *Essays Biochem* 63, 727–741. <https://doi.org/10.1042/EBC20190033>.

Hekmatpanah, D.S., and Young, R.A. (1991). Mutations in a conserved region of RNA polymerase II influence the accuracy of mRNA start site selection. *Mol Cell Biol* 11, 5781–5791. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.11.5781-5791.1991>.

Helenius, K., Yang, Y., Tselykh, T.V., Pessa, H.K.J., Frilander, M.J., and Mäkelä, T.P. (2011). Requirement of TFIIH kinase subunit Mat1 for RNA Pol II C-terminal domain Ser5 phosphorylation, transcription and mRNA turnover. *Nucleic Acids Res* 39, 5025–5035. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr107>.

Hengartner, C.J., Thompson, C.M., Zhang, J., Chao, D.M., Liao, S.M., Koleske, A.J., Okamura, S., and Young, R.A. (1995). Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev.* 9, 897–910. <https://doi.org/10.1101/gad.9.8.897>.

Hnisz, D., Shrinivas, K., Young, R.A., Chakraborty, A.K., and Sharp, P.A. (2017). A Phase Separation Model for Transcriptional Control. *Cell* 169, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.007>.

Holstege, F.C., van der Vliet, P.C., and Timmers, H.T. (1996). Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and

requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J* 15, 1666–1677. .

Holstege, F.C., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S., and Young, R.A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717–728. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81641-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81641-4).

Hou, L., Wang, Y., Liu, Y., Zhang, N., Shamovsky, I., Nudler, E., Tian, B., and Dynlacht, B.D. (2019). Paf1C regulates RNA polymerase II progression by modulating elongation rate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 14583–14592. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904324116>.

Hsieh, C.-L., Fei, T., Chen, Y., Li, T., Gao, Y., Wang, X., Sun, T., Sweeney, C.J., Lee, G.-S.M., Chen, S., et al. (2014). Enhancer RNAs participate in androgen receptor-driven looping that selectively enhances gene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 7319–7324. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324151111>.

Hsieh, T.-H.S., Weiner, A., Lajoie, B., Dekker, J., Friedman, N., and Rando, O.J. (2015). Mapping Nucleosome Resolution Chromosome Folding in Yeast by Micro-C. *Cell* 162, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.048>.

Hsu, J., Huang, J., Meluh, P.B., and Laurent, B.C. (2003). The Yeast RSC Chromatin-Remodeling Complex Is Required for Kinetochores Function in Chromosome Segregation. *Mol Cell Biol* 23, 3202–3215. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.9.3202-3215.2003>.

Hsu, J.-Y., Juven-Gershon, T., Marr, M.T., Wright, K.J., Tjian, R., and Kadonaga, J.T. (2008). TBP, Mot1, and NC2 establish a regulatory circuit that controls DPE-dependent versus TATA-dependent transcription. *Genes Dev* 22, 2353–2358. <https://doi.org/10.1101/gad.1681808>.

Hsu, K.-W., Chow, S.-Y., Su, B.-Y., Lu, Y.-H., Chen, C.-J., Chen, W.-L., Cheng, M.-Y., and Fan, H.-F. (2019). The synergy between RSC, Nap1 and adjacent nucleosome in nucleosome remodeling. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1862, 129–140.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.11.008>.

Hull, M.W., McKune, K., and Woychik, N.A. (1995). RNA polymerase II subunit RPB9 is required for accurate start site selection. *Genes Dev* 9, 481–490. <https://doi.org/10.1101/gad.9.4.481>.

Imasaki, T., Calero, G., Cai, G., Tsai, K.-L., Yamada, K., Cardelli, F., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Berger, I., Kornberg, G.L., et al. (2011). Architecture of the Mediator head module. *Nature* 475, 240–243. <https://doi.org/10.1038/nature10162>.

Ishiguro, A., Nogi, Y., Hisatake, K., Muramatsu, M., and Ishihama, A. (2000). The Rpb6 subunit of fission yeast RNA polymerase II is a contact target of the transcription elongation factor TFIIIS. *Mol Cell Biol* 20, 1263–1270. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.4.1263-1270.2000>.

Jamai, A., Puglisi, A., and Strubin, M. (2009). Histone chaperone spt16 promotes redeposition of the original h3-h4 histones evicted by elongating RNA polymerase. *Mol Cell* 35, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.001>.

James, K., Gamba, P., Cockell, S.J., and Zenkin, N. (2017). Misincorporation by RNA polymerase is a major source of transcription pausing in vivo. *Nucleic Acids Res* 45, 1105–1113. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw969>.

Jani, D., Valkov, E., and Stewart, M. (2014). Structural basis for binding the TREX2 complex to nuclear pores, GAL1 localisation and mRNA export. *Nucleic Acids Res* 42, 6686–6697. <https://doi.org/10.1093/nar/gku252>.

Jishage, M., Malik, S., Wagner, U., Uberheide, B., Ishihama, Y., Hu, X., Chait, B.T., Gnatt, A., Ren, B., and Roeder, R.G. (2012). Transcriptional regulation by Pol II(G) involving mediator and competitive interactions of Gdown1 and TFIIIF with Pol II. *Mol Cell* 45, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.014>.

Johnson, K.M., Wang, J., Smallwood, A., Arayata, C., and Carey, M. (2002). TFIID and human mediator coactivator complexes assemble

cooperatively on promoter DNA. *Genes Dev* 16, 1852–1863. <https://doi.org/10.1101/gad.995702>.

Kadoch, C., and Crabtree, G.R. (2013). Reversible disruption of mSWI/SNF (BAF) complexes by the SS18-SSX oncogenic fusion in synovial sarcoma. *Cell* 153, 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.036>.

Kadoch, C., Hargreaves, D.C., Hodges, C., Elias, L., Ho, L., Ranish, J., and Crabtree, G.R. (2013). Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat. Genet.* 45, 592–601. <https://doi.org/10.1038/ng.2628>.

Kadoch, C., Williams, R.T., Calarco, J.P., Miller, E.L., Weber, C.M., Braun, S.M.G., Pulice, J.L., Chory, E.J., and Crabtree, G.R. (2017). Dynamics of BAF-Polycomb complex opposition on heterochromatin in normal and oncogenic states. *Nat. Genet.* 49, 213–222. <https://doi.org/10.1038/ng.3734>.

Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., Berkum, N.L. van, Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., et al. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467, 430–435. <https://doi.org/10.1038/nature09380>.

Kang, J.S., Kim, S.H., Hwang, M.S., Han, S.J., Lee, Y.C., and Kim, Y.J. (2001). The structural and functional organization of the yeast mediator complex. *J Biol Chem* 276, 42003–42010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105961200>.

Kang, X., Hu, Y., Li, Y., Guo, X., Jiang, X., Lai, L., Xia, B., and Jin, C. (2006). Structural, biochemical, and dynamic characterizations of the hRPB8 subunit of human RNA polymerases. *J Biol Chem* 281, 18216–18226. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513241200>.

Kaplan, C.D., Laprade, L., and Winston, F. (2003). Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. *Science* 301, 1096–1099. <https://doi.org/10.1126/science.1087374>.

Kasten, M., Szerlong, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Werner,

M., and Cairns, B.R. (2004). Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *EMBO J* 23, 1348–1359. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600143>.

Kaufmann, R., Straussberg, R., Mandel, H., Fattal-Valevski, A., Ben-Zeev, B., Naamati, A., Shaag, A., Zenvirt, S., Konen, O., Mimouni-Bloch, A., et al. (2010). Infantile Cerebral and Cerebellar Atrophy Is Associated with a Mutation in the MED17 Subunit of the Transcription Preinitiation Mediator Complex. *Am J Hum Genet* 87, 667–670. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.09.016>.

Kelleher, R.J., Flanagan, P.M., and Kornberg, R.D. (1990). A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* 61, 1209–1215. .

Kim, M., Krogan, N.J., Vasiljeva, L., Rando, O.J., Nedeia, E., Greenblatt, J.F., and Buratowski, S. (2004). The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* 432, 517–522. <https://doi.org/10.1038/nature03041>.

Kim, S.S., Kim, M.S., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2013). Frameshift mutations of a chromatin-remodeling gene SMARCC2 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *APMIS* 121, 168–169. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02953.x>.

Kim, T.-K., Hemberg, M., Gray, J.M., Costa, A.M., Bear, D.M., Wu, J., Harmin, D.A., Laptevich, M., Barbara-Haley, K., Kuersten, S., et al. (2010). Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* 465, 182–187. <https://doi.org/10.1038/nature09033>.

Kim, Y.J., Björklund, S., Li, Y., Sayre, M.H., and Kornberg, R.D. (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77, 599–608. .

Kleefstra, T., Kramer, J.M., Neveling, K., Willemsen, M.H., Koemans, T.S., Vissers, L.E.L.M., Wissink-Lindhout, W., Fenckova, M., van den Akker, W.M.R., Kasri, N.N., et al. (2012). Disruption of an EHMT1-associated chromatin-modification module causes intellectual disability. *Am J*

Hum Genet 91, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.05.003>.

Klein, J., Nolden, M., Sanders, S.L., Kirchner, J., Weil, P.A., and Melcher, K. (2003). Use of a genetically introduced cross-linker to identify interaction sites of acidic activators within native transcription factor IID and SAGA. J Biol Chem 278, 6779–6786. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212514200>.

Knuesel, M.T., Meyer, K.D., Bernecky, C., and Taatjes, D.J. (2009). The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function. Genes Dev. 23, 439–451. <https://doi.org/10.1101/gad.1767009>.

Kobrynski, L.J., and Sullivan, K.E. (2007). Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. Lancet 370, 1443–1452. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61601-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61601-8).

Koga, M., Ishiguro, H., Yazaki, S., Horiuchi, Y., Arai, M., Niizato, K., Iritani, S., Itokawa, M., Inada, T., Iwata, N., et al. (2009). Involvement of SMARCA2/BRM in the SWI/SNF chromatin-remodeling complex in schizophrenia. Hum Mol Genet 18, 2483–2494. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp166>.

Kohlhaw, G.B. (2003). Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. Microbiol Mol Biol Rev 67, 1–15, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.1-15.2003>.

Komarnitsky, P., Cho, E.J., and Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. Genes Dev 14, 2452–2460. <https://doi.org/10.1101/gad.824700>.

Kopytova, D.V., Krasnov, A.N., Kopantceva, M.R., Nabirochkina, E.N., Nikolenko, J.V., Maksimenko, O., Kurshakova, M.M., Lebedeva, L.A., Yerokhin, M.M., Simonova, O.B., et al. (2006). Two Isoforms of Drosophila TRF2 Are Involved in Embryonic Development, Premeiotic Chromatin Condensation, and Proper Differentiation of Germ Cells of Both Sexes. Mol Cell Biol 26, 7492–7505. <https://doi.org/10.1128/MCB.00349-06>.

Kosho, T., Okamoto, N., and Coffin-Siris Syndrome International Collaborators (2014). Genotype-phenotype correlation of Coffin-Siris syndrome caused by mutations in SMARCB1, SMARCA4, SMARCE1, and ARID1A. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 166C, 262–275. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31407>.

Koyama, H., Itoh, M., Miyahara, K., and Tsuchiya, E. (2002). Abundance of the RSC nucleosome-remodeling complex is important for the cells to tolerate DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 531, 215–221. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03504-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03504-4).

Kremer, S.B., Kim, S., Jeon, J.O., Moustafa, Y.W., Chen, A., Zhao, J., and Gross, D.S. (2012). Role of Mediator in regulating Pol II elongation and nucleosome displacement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191, 95–106. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135806>.

Krietenstein, N., Wal, M., Watanabe, S., Park, B., Peterson, C.L., Pugh, B.F., and Korber, P. (2016). Genomic Nucleosome Organization Reconstituted with Pure Proteins. *Cell* 167, 709–721.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.045>.

Kubik, S., Bruzzone, M.J., Jacquet, P., Falcone, J.-L., Rougemont, J., and Shore, D. (2015). Nucleosome Stability Distinguishes Two Different Promoter Types at All Protein-Coding Genes in Yeast. *Mol Cell* 60, 422–434. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.002>.

Kuuselo, R., Savinainen, K., Sandström, S., Autio, R., and Kallioniemi, A. (2011). MED29, a component of the mediator complex, possesses both oncogenic and tumor suppressive characteristics in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 129, 2553–2565. <https://doi.org/10.1002/ijc.25924>.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116–120. <https://doi.org/10.1038/35065132>.

Lai, F., Orom, U.A., Cesaroni, M., Beringer, M., Taatjes, D.J., Blobel, G.A., and Shiekhhattar, R. (2013). Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription. *Nature* 494, 497–501. <https://doi.org/10.1038/nature11884>.

Lambert, S.A., Jolma, A., Campitelli, L.F., Das, P.K., Yin, Y., Albu, M., Chen, X., Taipale, J., Hughes, T.R., and Weirauch, M.T. (2018). The Human Transcription Factors. *Cell* 172, 650–665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029>.

Lange, M., Kaynak, B., Forster, U.B., Tönjes, M., Fischer, J.J., Grimm, C., Schlesinger, J., Just, S., Dunkel, I., Krueger, T., et al. (2008). Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex. *Genes Dev.* 22, 2370–2384. <https://doi.org/10.1101/gad.471408>.

Laurent, B.C., Yang, X., and Carlson, M. (1992). An essential *Saccharomyces cerevisiae* gene homologous to SNF2 encodes a helicase-related protein in a new family. *Mol. Cell. Biol.* 12, 1893–1902. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.4.1893>.

Leal, A., Huehne, K., Bauer, F., Sticht, H., Berger, P., Suter, U., Morera, B., Del Valle, G., Lupski, J.R., Ekici, A., et al. (2009). Identification of the variant Ala335Val of MED25 as responsible for CMT2B2: molecular data, functional studies of the SH3 recognition motif and correlation between wild-type MED25 and PMP22 RNA levels in CMT1A animal models. *Neurogenetics* 10, 275–287. <https://doi.org/10.1007/s10048-009-0183-3>.

Lee, J.-S., and Mendell, J.T. (2020). Antisense-Mediated Transcript Knockdown Triggers Premature Transcription Termination. *Molecular Cell* 77, 1044–1054.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.011>.

Lemon, B., Inouye, C., King, D.S., and Tjian, R. (2001). Selectivity of chromatin-remodelling cofactors for ligand-activated transcription. *Nature* 414, 924–928. <https://doi.org/10.1038/414924a>.

Lenstra, T.L., Rodriguez, J., Chen, H., and Larson, D.R. (2016). Transcription Dynamics in Living Cells. *Annu Rev Biophys* 45, 25–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010838>.

Léonard, V.H.J., Kohl, A., Hart, T.J., and Elliott, R.M. (2006). Interaction of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs Protein with Mediator Protein MED8: a Mechanism for Inhibiting the Interferon Response. *J Virol* 80, 9667–9675. <https://doi.org/10.1128/JVI.00822-06>.

Leschziner, A.E., Lemon, B., Tjian, R., and Nogales, E. (2005). Structural Studies of the Human PBAF Chromatin-Remodeling Complex. *Structure* 13, 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.12.008>.

Lessard, J., Wu, J.I., Ranish, J.A., Wan, M., Winslow, M.M., Staahl, B.T., Wu, H., Aebbersold, R., Graef, I.A., and Crabtree, G.R. (2007). An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron* 55, 201–215. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.019>.

Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707–719. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>.

Li, L.-H., He, J., Hua, D., Guo, Z.-J., and Gao, Q. (2011a). Lentivirus-mediated inhibition of Med19 suppresses growth of breast cancer cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* 68, 207–215. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1468-9>.

Li, P., Yu, X., Ge, K., Melamed, J., Roeder, R.G., and Wang, Z. (2002). Heterogeneous Expression and Functions of Androgen Receptor Co-Factors in Primary Prostate Cancer. *Am J Pathol* 161, 1467–1474. .

Li, Y., Liu, M., Chen, L.-F., and Chen, R. (2018). P-TEFb: Finding its ways to release promoter-proximally paused RNA polymerase II. *Transcription* 9, 88–94. <https://doi.org/10.1080/21541264.2017.1281864>.

Li, Z., Vizeacoumar, F.J., Bahr, S., Li, J., Warringer, J., Vizeacoumar, F.S., Min, R., Vandersluis, B., Bellay, J., Devit, M., et al. (2011b). Systematic exploration of essential yeast gene function with temperature-sensitive mutants. *Nat Biotechnol* 29, 361–367. <https://doi.org/10.1038/nbt.1832>.

Lin, C., Smith, E.R., Takahashi, H., Lai, K.-C., Martin-Brown, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, J.W., Conaway, R.C., and Shilatifard, A. (2010). AFF4, a component of the ELL/p-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras can link transcription elongation to leukemia. *Mol Cell* 37, 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.026>.

Lin, P.S., Dubois, M.-F., and Dahmus, M.E. (2002). TFIIIF-associating carboxyl-terminal domain phosphatase dephosphorylates phosphoserines 2 and 5 of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 277, 45949–45956. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208588200>.

Liu, Z., and Myers, L.C. (2012). Med5(Nut1) and Med17(Srb4) Are Direct Targets of Mediator Histone H4 Tail Interactions. *PLOS ONE* 7, e38416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038416>.

Long, H.K., Prescott, S.L., and Wysocka, J. (2016). Ever-Changing Landscapes: Transcriptional Enhancers in Development and Evolution. *Cell* 167, 1170–1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.018>.

Lorch, Y., and Kornberg, R.D. (2017). Chromatin-remodeling for transcription. *Q Rev Biophys* 50, e5. <https://doi.org/10.1017/S003358351700004X>.

Lorch, Y., LaPointe, J.W., and Kornberg, R.D. (1987). Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 49, 203–210. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90561-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90561-7).

Lorch, Y., Zhang, M., and Kornberg, R.D. (1999). Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* 96, 389–392. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80551-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80551-6).

Lorch, Y., Beve, J., Gustafsson, C.M., Myers, L.C., and Kornberg, R.D. (2000). Mediator-nucleosome interaction. *Mol. Cell* 6, 197–201. .

Lorch, Y., Zhang, M., and Kornberg, R.D. (2001). RSC unravels the nucleosome. *Mol Cell* 7, 89–95. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00157-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00157-5).

Lorch, Y., Davis, B., and Kornberg, R.D. (2005). Chromatin remodeling by DNA bending, not twisting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1329–1332. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409413102>.

Lorch, Y., Griesenbeck, J., Boeger, H., Maier-Davis, B., and Kornberg, R.D. (2011). Selective removal of promoter nucleosomes by the RSC chromatin-remodeling complex. *Nat Struct Mol Biol* 18, 881–885.

<https://doi.org/10.1038/nsmb.2072>.

Lorch, Y., Maier-Davis, B., and Kornberg, R.D. (2018). Histone Acetylation Inhibits RSC and Stabilizes the +1 Nucleosome. *Mol Cell* 72, 594-600.e2. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.030>.

Lu, H., Yu, D., Hansen, A.S., Ganguly, S., Liu, R., Heckert, A., Darzacq, X., and Zhou, Q. (2018). Phase-separation mechanism for C-terminal hyperphosphorylation of RNA polymerase II. *Nature* 558, 318–323. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0174-3>.

Malik, S., Barrero, M.J., and Jones, T. (2007). Identification of a regulator of transcription elongation as an accessory factor for the human Mediator coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6182–6187. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608717104>.

Mandel, C.R., Kaneko, S., Zhang, H., Gebauer, D., Vethantham, V., Manley, J.L., and Tong, L. (2006). Polyadenylation factor CPSF-73 is the pre-mRNA 3'-end-processing endonuclease. *Nature* 444, 953–956. <https://doi.org/10.1038/nature05363>.

Martínez-Fernández, V., and Navarro, F. (2018). Rpb5, a subunit shared by eukaryotic RNA polymerases, cooperates with prefoldin-like Bud27/URI. *AIMS Genet* 5, 63–74. <https://doi.org/10.3934/genet.2018.1.74>.

Mas, G., de Nadal, E., Dechant, R., de la Concepción, M.L.R., Logie, C., Jimeno-González, S., Chávez, S., Ammerer, G., and Posas, F. (2009). Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *EMBO J* 28, 326–336. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.299>.

Mason, P.B., and Struhl, K. (2003). The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation in vivo. *Mol Cell Biol* 23, 8323–8333. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.22.8323-8333.2003>.

McBride, M.J., Pulice, J.L., Beird, H.C., Ingram, D.R., D'Avino, A.R., Shern, J.F., Charville, G.W., Hornick, J.L., Nakayama, R.T., Garcia-Rivera, E.M., et al. (2018). The SS18-SSX Fusion Oncoprotein Hijacks BAF Complex

Targeting and Function to Drive Synovial Sarcoma. *Cancer Cell* 33, 1128–1141.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.05.002>.

McGinty, R.K., and Tan, S. (2015). Nucleosome Structure and Function. *Chem Rev* 115, 2255–2273. <https://doi.org/10.1021/cr500373h>.

Meneghini, M.D., Wu, M., and Madhani, H.D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 112, 725–736. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00123-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00123-5).

Meyer, K.D., Lin, S.-C., Bernecky, C., Gao, Y., and Taatjes, D.J. (2010). p53 activates transcription by directing structural shifts in Mediator. *Nat Struct Mol Biol* 17, 753–760. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1816>.

Michel, B.C., D'Avino, A.R., Cassel, S.H., Mashtalir, N., McKenzie, Z.M., McBride, M.J., Valencia, A.M., Zhou, Q., Bocker, M., Soares, L.M.M., et al. (2018). A non-canonical SWI/SNF complex is a synthetic lethal target in cancers driven by BAF complex perturbation. *Nat Cell Biol* 20, 1410–1420. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0221-1>.

Miller, C., Matic, I., Maier, K.C., Schwalb, B., Roether, S., Strässer, K., Tresch, A., Mann, M., and Cramer, P. (2012). Mediator phosphorylation prevents stress response transcription during non-stress conditions. *J Biol Chem* 287, 44017–44026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.430140>.

Mittler, G., Stühler, T., Santolin, L., Uhlmann, T., Kremmer, E., Lottspeich, F., Berti, L., and Meisterernst, M. (2003). A novel docking site on Mediator is critical for activation by VP16 in mammalian cells. *EMBO J* 22, 6494–6504. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg619>.

Miyao, T., and Woychik, N.A. (1998). RNA polymerase subunit RPB5 plays a role in transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15281–15286. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15281>.

Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.-H., Sen, S., and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303, 343–348. <https://doi.org/10.1126/science.1090701>.

Monteiro, P.T., Oliveira, J., Pais, P., Antunes, M., Palma, M., Cavalheiro, M., Galocha, M., Godinho, C.P., Martins, L.C., Bourbon, N., et al. (2020). YEASTRACT+: a portal for cross-species comparative genomics of transcription regulation in yeasts. *Nucleic Acids Research* 48, D642–D649. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz859>.

Moore-Morris, T., van Vliet, P.P., Andelfinger, G., and Puceat, M. (2018). Role of Epigenetics in Cardiac Development and Congenital Diseases. *Physiol Rev* 98, 2453–2475. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2017>.

Morey, L. (2016). Polycomb meets mediator to balance pluripotency and differentiation. *Cell Cycle* 15, 1807–1808. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1184511>.

Morgan, M.A.J., and Shilatifard, A. (2020). Reevaluating the roles of histone-modifying enzymes and their associated chromatin modifications in transcriptional regulation. *Nat Genet* 52, 1271–1281. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00736-4>.

Mukhopadhyay, A., Kramer, J.M., Merks, G., Lugtenberg, D., Smeets, D.F., Oortveld, M.A.W., Blokland, E.A.W., Agrawal, J., Schenck, A., van Bokhoven, H., et al. (2010). CDK19 is disrupted in a female patient with bilateral congenital retinal folds, microcephaly and mild mental retardation. *Hum Genet* 128, 281–291. <https://doi.org/10.1007/s00439-010-0848-x>.

Müller, F., and Tora, L. (2014). Chromatin and DNA sequences in defining promoters for transcription initiation. *Biochim Biophys Acta* 1839, 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.11.003>.

Muncke, N., Jung, C., Rüdiger, H., Ulmer, H., Roeth, R., Hubert, A., Goldmuntz, E., Driscoll, D., Goodship, J., Schön, K., et al. (2003). Missense mutations and gene interruption in PROSIT240, a novel TRAP240-like gene, in patients with congenital heart defect (transposition of the great arteries). *Circulation* 108, 2843–2850. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000103684.77636.CD>.

Murawska, M., and Brehm, A. (2011). CHD chromatin remodelers and the transcription cycle. *Transcription* 2, 244–253.

<https://doi.org/10.4161/trns.2.6.17840>.

Mylona, A., Theillet, F.-X., Foster, C., Cheng, T.M., Miralles, F., Bates, P.A., Selenko, P., and Treisman, R. (2016). Opposing effects of Elk-1 multisite phosphorylation shape its response to ERK activation. *Science* 354, 233–237. <https://doi.org/10.1126/science.aad1872>.

Näär, A.M., Beaurang, P.A., Zhou, S., Abraham, S., Solomon, W., and Tjian, R. (1999). Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. *Nature* 398, 828–832. <https://doi.org/10.1038/19789>.

Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., and Grewal, S.I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292, 110–113. <https://doi.org/10.1126/science.1060118>.

Napolitano, G., Lania, L., and Majello, B. (2014). RNA polymerase II CTD modifications: how many tales from a single tail. *J Cell Physiol* 229, 538–544. <https://doi.org/10.1002/jcp.24483>.

Ndong, J. de L.C., Jean, D., Rousselet, N., and Frade, R. (2009). Down-regulation of the expression of RB18A/MED1, a cofactor of transcription, triggers strong tumorigenic phenotype of human melanoma cells. *Int J Cancer* 124, 2597–2606. <https://doi.org/10.1002/ijc.24253>.

Neale, B.M., Kou, Y., Liu, L., Ma'ayan, A., Samocha, K.E., Sabo, A., Lin, C.-F., Stevens, C., Wang, L.-S., Makarov, V., et al. (2012). Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* 485, 242–245. <https://doi.org/10.1038/nature11011>.

Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., and Struhl, K. (2002). Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev.* 16, 806–819. <https://doi.org/10.1101/gad.978902>.

Ng, H.H., Ciccone, D.N., Morshead, K.B., Oettinger, M.A., and Struhl, K. (2003). Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: A potential mechanism for position-effect

variegation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1820–1825. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437846100>.

Nguyen, V.Q., Ranjan, A., Liu, S., Tang, X., Ling, Y.H., Wisniewski, J., Mizuguchi, G., Li, K.Y., Jou, V., Zheng, Q., et al. (2021). Spatiotemporal coordination of transcription preinitiation complex assembly in live cells. *Mol Cell* 81, 3560–3575.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.07.022>.

Niimi, A., Chambers, A.L., Downs, J.A., and Lehmann, A.R. (2012). A role for chromatin remodellers in replication of damaged DNA. *Nucleic Acids Res* 40, 7393–7403. <https://doi.org/10.1093/nar/gks453>.

Nishikawa, J.L., Boeszoermenyi, A., Vale-Silva, L.A., Torelli, R., Posteraro, B., Sohn, Y.-J., Ji, F., Gelev, V., Sanglard, D., Sanguinetti, M., et al. (2016). Inhibiting fungal multidrug resistance by disrupting an activator-Mediator interaction. *Nature* 530, 485–489. <https://doi.org/10.1038/nature16963>.

Nock, A., Ascano, J.M., Barrero, M.J., and Malik, S. (2012). Mediator-regulated transcription through the +1 nucleosome. *Mol Cell* 48, 837–848. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.009>.

Nojima, T., Gomes, T., Grosso, A.R.F., Kimura, H., Dye, M.J., Dhir, S., Carmo-Fonseca, M., and Proudfoot, N.J. (2015). Mammalian NET-Seq Reveals Genome-wide Nascent Transcription Coupled to RNA Processing. *Cell* 161, 526–540. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.027>.

Nonet, M.L., and Young, R.A. (1989). Intragenic and Extragenic Suppressors of Mutations in the Heptapeptide Repeat Domain of *Saccharomyces Cerevisiae* RNA Polymerase II. *Genetics* 123, 715–724. .

Nora, E.P., Lajoie, B.R., Schulz, E.G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., Piolot, T., van Berkum, N.L., Meisig, J., Sedat, J., et al. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation center. *Nature* 485, 381–385. <https://doi.org/10.1038/nature11049>.

Okamoto, T., Yamamoto, S., Watanabe, Y., Ohta, T., Hanaoka, F., Roeder, R.G., and Ohkuma, Y. (1998). Analysis of the Role of TFIIE in

Transcriptional Regulation through Structure-Function Studies of the TFIIE β Subunit*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 19866–19876. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19866>.

Oruettebarria, I., Venturini, F., Kekarainen, T., Houweling, A., Zijderduijn, L.M.P., Mohd-Sarip, A., Vries, R.G.J., Hoebe, R.C., and Verrijzer, C.P. (2004). P16INK4a is required for hSNF5 chromatin remodeler-induced cellular senescence in malignant rhabdoid tumor cells. *J Biol Chem* 279, 3807–3816. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309333200>.

Pan, H., Bilinovich, S.M., Kaur, P., Riehn, R., Wang, H., and Williams, D.C. (2017). CpG and methylation-dependent DNA binding and dynamics of the methylcytosine binding domain 2 protein at the single-molecule level. *Nucleic Acids Res* 45, 9164–9177. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx548>.

Papadopoulos, P., Gutiérrez, L., Demmers, J., Scheer, E., Pourfarzad, F., Papageorgiou, D.N., Karkoulia, E., Strouboulis, J., van de Werken, H.J.G., van der Linden, R., et al. (2015). TAF10 Interacts with the GATA1 Transcription Factor and Controls Mouse Erythropoiesis. *Mol Cell Biol* 35, 2103–2118. <https://doi.org/10.1128/MCB.01370-14>.

Papadopoulou, T., Kaymak, A., Sayols, S., and Richly, H. (2016). Dual role of Med12 in PRC1-dependent gene repression and ncRNA-mediated transcriptional activation. *Cell Cycle* 15, 1479–1493. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1175797>.

Parnell, T.J., Huff, J.T., and Cairns, B.R. (2008). RSC regulates nucleosome positioning at Pol II genes and density at Pol III genes. *EMBO J* 27, 100–110. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601946>.

Parua, P.K., Booth, G.T., Sansó, M., Benjamin, B., Tanny, J.C., Lis, J.T., and Fisher, R.P. (2018). A Cdk9–PP1 switch regulates the elongation–termination transition of RNA polymerase II. *Nature* 558, 460–464. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0214-z>.

Patel, A.B., Louder, R.K., Greber, B.J., Grünberg, S., Luo, J., Fang, J., Liu, Y., Ranish, J., Hahn, S., and Nogales, E. (2018). Structure of human TFIID and mechanism of TBP loading onto promoter DNA. *Science*

362, eaau8872. <https://doi.org/10.1126/science.aau8872>.

Patel, A.B., Moore, C.M., Greber, B.J., Luo, J., Zukin, S.A., Ranish, J., and Nogales, E. (2019). Architecture of the chromatin remodeler RSC and insights into its nucleosome engagement. *ELife* 8, e54449. <https://doi.org/10.7554/eLife.54449>.

Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A., and Reinberg, D. (2006). Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* 125, 703–717. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.029>.

Peissert, S., Sauer, F., Grabarczyk, D.B., Braun, C., Sander, G., Poterszman, A., Egly, J.-M., Kuper, J., and Kisker, C. (2020). In TFIIH the Arch domain of XPD is mechanistically essential for transcription and DNA repair. *Nat Commun* 11, 1667. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15241-9>.

Peterlin, B.M., and Price, D.H. (2006). Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* 23, 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.014>.

Plaschka, C., Larivière, L., Wenzek, L., Seizl, M., Hemann, M., Tegunov, D., Petrotchenko, E.V., Borchers, C.H., Baumeister, W., Herzog, F., et al. (2015). Architecture of the RNA polymerase II–Mediator core initiation complex. *Nature* 518, 376–380. <https://doi.org/10.1038/nature14229>.

Pointud, J.-C., Mengus, G., Brancorsini, S., Monaco, L., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., and Davidson, I. (2003). The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation. *J Cell Sci* 116, 1847–1858. <https://doi.org/10.1242/jcs.00391>.

Pott, S., and Lieb, J.D. (2015). What are super-enhancers? *Nat Genet* 47, 8–12. <https://doi.org/10.1038/ng.3167>.

Purnell, B.A., Emanuel, P.A., and Gilmour, D.S. (1994). TFIID sequence recognition of the initiator and sequences farther downstream in

Drosophila class II genes. *Genes Dev.* 8, 830–842. <https://doi.org/10.1101/gad.8.7.830>.

Quevedo, M., Meert, L., Dekker, M.R., Dekkers, D.H.W., Brandsma, J.H., van den Berg, D.L.C., Ozgür, Z., van IJcken, W.F.J., Demmers, J., Fornerod, M., et al. (2019). Mediator complex interaction partners organize the transcriptional network that defines neural stem cells. *Nat Commun* 10, 2669. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10502-8>.

Rachez, C., Lemon, B.D., Suldan, Z., Bromleigh, V., Gamble, M., Näär, A.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Freedman, L.P. (1999). Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* 398, 824–828. <https://doi.org/10.1038/19783>.

Rahl, P.B., Lin, C.Y., Seila, A.C., Flynn, R.A., McCuine, S., Burge, C.B., Sharp, P.A., and Young, R.A. (2010). c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 141, 432–445. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.030>.

Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J., and Madhani, H.D. (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 123, 233–248. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.002>.

Ramachandran, S., Zentner, G.E., and Henikoff, S. (2015). Asymmetric nucleosomes flank promoters in the budding yeast genome. *Genome Res* 25, 381–390. <https://doi.org/10.1101/gr.182618.114>.

Ramos, P., Karnezis, A.N., Hendricks, W.P.D., Wang, Y., Tembe, W., Zismann, V.L., Legendre, C., Liang, W.S., Russell, M.L., Craig, D.W., et al. (2014). Loss of the tumor suppressor SMARCA4 in small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type (SCCOHT). *Rare Dis* 2, e967148. <https://doi.org/10.4161/2167549X.2014.967148>.

Rengachari, S., Schilbach, S., Aibara, S., Dienemann, C., and Cramer, P. (2021). Structure of the human Mediator–RNA polymerase II pre-initiation complex. *Nature* 594, 129–133. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03555-7>.

Rhee, H.S., and Pugh, B.F. (2012). Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature* 483, 295–301. <https://doi.org/10.1038/nature10799>.

Rhee, H.S., Bataille, A.R., Zhang, L., and Pugh, B.F. (2014). Subnucleosomal structures and nucleosome asymmetry across a genome. *Cell* 159, 1377–1388. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.054>.

Richter, W.F., Nayak, S., Iwasa, J., and Taatjes, D.J. (2022). The Mediator complex as a master regulator of transcription by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00498-3>.

Risheg, H., Graham, J.M., Clark, R.D., Rogers, R.C., Opitz, J.M., Moeschler, J.B., Peiffer, A.P., May, M., Joseph, S.M., Jones, J.R., et al. (2007). A recurrent mutation in MED12 leading to R961W causes Opitz-Kaveggia syndrome. *Nat Genet* 39, 451–453. <https://doi.org/10.1038/ng1992>.

Robinson, P.J., Trnka, M.J., Pellarin, R., Greenberg, C.H., Bushnell, D.A., Davis, R., Burlingame, A.L., Sali, A., and Kornberg, R.D. (2015). Molecular architecture of the yeast Mediator complex. *Elife* 4, e08719. <https://doi.org/10.7554/eLife.08719>.

Robinson, P.J., Trnka, M.J., Bushnell, D.A., Davis, R.E., Mattei, P.-J., Burlingame, A.L., and Kornberg, R.D. (2016). Structure of a Complete Mediator-RNA Polymerase II Pre-Initiation Complex. *Cell* 166, 1411–1422.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.050>.

Robinson, P.J.J., Bushnell, D.A., Trnka, M.J., Burlingame, A.L., and Kornberg, R.D. (2012). Structure of the Mediator Head module bound to the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *PNAS* 109, 17931–17935. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215241109>.

Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21, 327–335. .

Rondón, A.G., Mischo, H.E., Kawauchi, J., and Proudfoot, N.J. (2009). Fail-Safe Transcriptional Termination for Protein-Coding Genes in *S.*

cerevisiae. Mol Cell 36, 88–98.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.028>.

Roupelieva, M., Griffiths, S.J., Kremmer, E., Meisterernst, M., Viejo-Borbolla, A., Schulz, T., and Haas, J. (2010). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus Lana-1 is a major activator of the serum response element and mitogen-activated protein kinase pathways via interactions with the Mediator complex. *J Gen Virol* 91, 1138–1149.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.017715-0>.

Rowe, S.P., and Mapp, A.K. (2008). Assessing the Permissiveness of Transcriptional Activator Binding Sites. *Biopolymers* 89, 578–581.
<https://doi.org/10.1002/bip.20946>.

Runner, V.M., Podolny, V., and Buratowski, S. (2008). The Rpb4 subunit of RNA polymerase II contributes to cotranscriptional recruitment of 3' processing factors. *Mol Cell Biol* 28, 1883–1891.
<https://doi.org/10.1128/MCB.01714-07>.

Ryu, S., Zhou, S., Ladurner, A.G., and Tjian, R. (1999). The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* 397, 446–450.
<https://doi.org/10.1038/17141>.

Sabari, B.R., Dall'Agnese, A., Boija, A., Klein, I.A., Coffey, E.L., Shrinivas, K., Abraham, B.J., Hannett, N.M., Zamudio, A.V., Manteiga, J.C., et al. (2018). Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* 361, eaar3958.
<https://doi.org/10.1126/science.aar3958>.

Saha, A., Wittmeyer, J., and Cairns, B.R. (2006). Mechanisms for Nucleosome Movement by ATP-dependent Chromatin Remodeling Complexes. In *Chromatin Dynamics in Cellular Function*, B.C. Laurent, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 127–148.

Sampath, V., and Sadhale, P. (2005). Rpb4 and Rpb7: a sub-complex integral to multi-subunit RNA polymerases performs a multitude of functions. *IUBMB Life* 57, 93–102.
<https://doi.org/10.1080/15216540500078905>.

Santen, G.W.E., Aten, E., Vulto-van Silfhout, A.T., Pottinger, C., van Bon, B.W.M., van Minderhout, I.J.H.M., Snowdowne, R., van der Lans, C.A.C., Boogaard, M., Linssen, M.M.L., et al. (2013). Coffin-Siris syndrome and the BAF complex: genotype-phenotype study in 63 patients. *Hum Mutat* 34, 1519–1528. <https://doi.org/10.1002/humu.22394>.

Sato, S., Tomomori-Sato, C., Tsai, K.-L., Yu, X., Sardi, M., Saraf, A., Washburn, M.P., Florens, L., Asturias, F.J., Conaway, R.C., et al. (2016). Role for the MED21-MED7 Hinge in Assembly of the Mediator-RNA Polymerase II Holoenzyme. *J Biol Chem* 291, 26886–26898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.756098>.

Schier, A.C., and Taatjes, D.J. (2020). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes Dev* 34, 465–488. <https://doi.org/10.1101/gad.335679.119>.

Schilbach, S., Hantsche, M., Tegunov, D., Dienemann, C., Wigge, C., Urlaub, H., and Cramer, P. (2017). Structures of transcription pre-initiation complex with TFIID and Mediator. *Nature* 551, 204–209. <https://doi.org/10.1038/nature24282>.

Schneider, M., Hellerschmied, D., Schubert, T., Amlacher, S., Vinayachandran, V., Reja, R., Pugh, B.F., Clausen, T., and Köhler, A. (2015). The Nuclear Pore-Associated TREX-2 Complex Employs Mediator to Regulate Gene Expression. *Cell* 162, 1016–1028. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.059>.

Schweikhard, V., Meng, C., Murakami, K., Kaplan, C.D., Kornberg, R.D., and Block, S.M. (2014). Transcription factors TFIIF and TFIIS promote transcript elongation by RNA polymerase II by synergistic and independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 6642–6647. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405181111>.

Sheridan, R.M., Fong, N., D'Alessandro, A., and Bentley, D.L. (2019). Widespread backtracking by RNA pol II is a major effector of gene activation, 5' pause release, termination and transcription elongation rate. *Mol Cell* 73, 107–118.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.031>.

Shilatifard, A. (2012). The COMPASS family of histone H3K4

methylnases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annu Rev Biochem* 81, 65–95. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051710-134100>.

Shim, E.Y., Ma, J.-L., Oum, J.-H., Yanez, Y., and Lee, S.E. (2005). The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 25, 3934–3944. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.10.3934-3944.2005>.

Shim, E.Y., Hong, S.J., Oum, J.-H., Yanez, Y., Zhang, Y., and Lee, S.E. (2007). RSC mobilizes nucleosomes to improve accessibility of repair machinery to the damaged chromatin. *Mol Cell Biol* 27, 1602–1613. <https://doi.org/10.1128/MCB.01956-06>.

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

Simic, R., Lindstrom, D.L., Tran, H.G., Roinick, K.L., Costa, P.J., Johnson, A.D., Hartzog, G.A., and Arndt, K.M. (2003). Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *EMBO J* 22, 1846–1856. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg179>.

Singh, S., Szlachta, K., Manukyan, A., Raimer, H.M., Dinda, M., Bekiranov, S., and Wang, Y.-H. (2020). Pausing sites of RNA polymerase II on actively transcribed genes are enriched in DNA double-stranded breaks. *J Biol Chem* 295, 3990–4000. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011665>.

Siriaco, G., Deuring, R., Chioda, M., Becker, P.B., and Tamkun, J.W. (2009). *Drosophila* ISWI Regulates the Association of Histone H1 With Interphase Chromosomes in Vivo. *Genetics* 182, 661–669. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.102053>.

Soutourina, J. (2018). Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 262–274. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.115>.

Soutourina, J., Bordas-Le Floch, V., Gendrel, G., Flores, A., Ducrot, C.,

Dumay-Odelot, H., Soularue, P., Navarro, F., Cairns, B.R., Lefebvre, O., et al. (2006). Rsc4 Connects the Chromatin Remodeler RSC to RNA Polymerases. *Mol Cell Biol* 26, 4920–4933. <https://doi.org/10.1128/MCB.00415-06>.

Soutourina, J., Wydau, S., Ambroise, Y., Boschiero, C., and Werner, M. (2011). Direct interaction of RNA polymerase II and mediator required for transcription in vivo. *Science* 331, 1451–1454. <https://doi.org/10.1126/science.1200188>.

Spaeth, J.M., Kim, N.H., and Boyer, T.G. (2011). Mediator and human disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 776–787. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.07.024>.

Spain, M.M., Ansari, S.A., Pathak, R., Palumbo, M.J., Morse, R.H., and Govind, C.K. (2014). The RSC Complex localizes to coding sequences to regulate Pol II and histone occupancy. *Mol Cell* 56, 653–666. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.002>.

Srivas, R., Costelloe, T., Carvunis, A.-R., Sarkar, S., Malta, E., Sun, S.M., Pool, M., Licon, K., van Welsem, T., van Leeuwen, F., et al. (2013). A UV-Induced Genetic Network Links the RSC Complex to Nucleotide Excision Repair and Shows Dose-Dependent Rewiring. *Cell Rep* 5, 1714–1724. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.035>.

Steinparzer, I., Sedlyarov, V., Rubin, J.D., Eislmayr, K., Galbraith, M.D., Levandowski, C.B., Vcelkova, T., Sneezum, L., Wascher, F., Amman, F., et al. (2019). Transcriptional Responses to IFN- γ Require Mediator Kinase-Dependent Pause Release and Mechanistically Distinct CDK8 and CDK19 Functions. *Mol Cell* 76, 485–499.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.034>.

Stephens, P.J., Tarpey, P.S., Davies, H., Van Loo, P., Greenman, C., Wedge, D.C., Nik-Zainal, S., Martin, S., Varela, I., Bignell, G.R., et al. (2012). The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* 486, 400–404. <https://doi.org/10.1038/nature11017>.

Sugiura, S., Kashiwabara, S., Iwase, S., and Baba, T. (2003). Expression of a testis-specific form of TBP-related factor 2 (TRF2) mRNA during

mouse spermatogenesis. *J Reprod Dev* 49, 107–111. <https://doi.org/10.1262/jrd.49.107>.

Suka, N., Suka, Y., Carmen, A.A., Wu, J., and Grunstein, M. (2001). Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Mol Cell* 8, 473–479. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00301-x](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00301-x).

Sun, M., Jiang, R., Li, J.-D., Luo, S.-L., Gao, H.-W., Jin, C.-Y., Shi, D.-L., Wang, C.-G., Wang, B., and Zhang, X.-Y. (2011). MED19 promotes proliferation and tumorigenesis of lung cancer. *Mol Cell Biochem* 355, 27–33. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0835-0>.

Sun, X., Hota, S.K., Zhou, Y.-Q., Novak, S., Miguel-Perez, D., Christodoulou, D., Seidman, C.E., Seidman, J.G., Gregorio, C.C., Henkelman, R.M., et al. (2017). Cardiac-enriched BAF chromatin-remodeling complex subunit Baf60c regulates gene expression programs essential for heart development and function. *Biol Open* 7, bio029512. <https://doi.org/10.1242/bio.029512>.

Sun, Y., Zhang, Y., Aik, W.S., Yang, X.-C., Marzluff, W.F., Walz, T., Dominski, Z., and Tong, L. (2020). Structure of an active human histone pre-mRNA 3'-end processing machinery. *Science* 367, 700–703. <https://doi.org/10.1126/science.aaz7758>.

Taatjes, D.J., Näär, A.M., Andel, F., Nogales, E., and Tjian, R. (2002). Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science* 295, 1058–1062. <https://doi.org/10.1126/science.1065249>.

Takahashi, H., Parmely, T.J., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Banks, C.A.S., Kong, S.E., Szutorisz, H., Swanson, S.K., Martin-Brown, S., Washburn, M.P., et al. (2011). Human mediator subunit MED26 functions as a docking site for transcription elongation factors. *Cell* 146, 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.005>.

Tan, Q., Linask, K.L., Ebright, R.H., and Woychik, N.A. (2000). Activation mutants in yeast RNA polymerase II subunit RPB3 provide evidence for a structurally conserved surface required for activation in eukaryotes and bacteria. *Genes Dev* 14, 339–348. .

Tatarakis, A., Margaritis, T., Martinez-Jimenez, C.P., Kouskouti, A., Mohan, W.S., Haroniti, A., Kafetzopoulos, D., Tora, L., and Talianidis, I. (2008). Dominant and redundant functions of TFIID involved in the regulation of hepatic genes. *Mol Cell* 31, 531–543. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.07.013>.

Thomas, M.C., and Chiang, C.-M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41, 105–178. <https://doi.org/10.1080/10409230600648736>.

Thomas, M.J., Platas, A.A., and Hawley, D.K. (1998). Transcriptional fidelity and proofreading by RNA polymerase II. *Cell* 93, 627–637. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81191-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81191-5).

Thompson, C.M., and Young, R.A. (1995). General requirement for RNA polymerase II holoenzymes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4587–4590. .

Thompson, C.M., Koleske, A.J., Chao, D.M., and Young, R.A. (1993). A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell* 73, 1361–1375. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90362-T](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90362-T).

Tsai, K.-L., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Asturias, F.J. (2013). A conserved Mediator-CDK8 kinase module association regulates Mediator-RNA polymerase II interaction. *Nat Struct Mol Biol* 20, 611–619. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2549>.

Tsai, K.-L., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Asturias, F.J. (2014). Subunit architecture and functional modular rearrangements of the transcriptional Mediator complex. *Cell* 157, 1430–1444. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.015>.

Tsai, K.-L., Yu, X., Gopalan, S., Chao, T.-C., Zhang, Y., Florens, L., Washburn, M.P., Murakami, K., Conaway, R.C., Conaway, J.W., et al. (2017). Mediator structure and rearrangements required for holoenzyme formation. *Nature* 544, 196–201. <https://doi.org/10.1038/nature21393>.

Van Houdt, J.K.J., Nowakowska, B.A., Sousa, S.B., van Schaik, B.D.C.,

Seuntjens, E., Avonce, N., Sifrim, A., Abdul-Rahman, O.A., van den Boogaard, M.-J.H., Bottani, A., et al. (2012). Heterozygous missense mutations in SMARCA2 cause Nicolaides-Baraitser syndrome. *Nat Genet* 44, 445–449, S1. <https://doi.org/10.1038/ng.1105>.

Van Mullem, V., Wery, M., Werner, M., Vandenhaute, J., and Thuriaux, P. (2002). The Rpb9 subunit of RNA polymerase II binds transcription factor TFIIE and interferes with the SAGA and elongator histone acetyltransferases. *J Biol Chem* 277, 10220–10225. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107207200>.

Varela, I., Tarpey, P., Raine, K., Huang, D., Ong, C.K., Stephens, P., Davies, H., Jones, D., Lin, M.-L., Teague, J., et al. (2011). Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* 469, 539–542. <https://doi.org/10.1038/nature09639>.

Vermeulen, M., Mulder, K.W., Denissov, S., Pijnappel, W.W.M.P., van Schaik, F.M.A., Varier, R.A., Baltissen, M.P.A., Stunnenberg, H.G., Mann, M., and Timmers, H.T.M. (2007). Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* 131, 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.016>.

Versteeg, I., Sévenet, N., Lange, J., Rousseau-Merck, M.F., Ambros, P., Handgretinger, R., Aurias, A., and Delattre, O. (1998). Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 394, 203–206. <https://doi.org/10.1038/28212>.

Vijayvargia, R., May, M.S., and Fondell, J.D. (2007). A coregulatory role for the mediator complex in prostate cancer cell proliferation and gene expression. *Cancer Res.* 67, 4034–4041. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3039>.

Vos, S.M., Farnung, L., Boehning, M., Wigge, C., Linden, A., Urlaub, H., and Cramer, P. (2018). Structure of activated transcription complex Pol II–DSIF–PAF–SPT6. *Nature* 560, 607–612. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0440-4>.

Wagner, F.R., Dienemann, C., Wang, H., Stützer, A., Tegunov, D., Urlaub, H., and Cramer, P. (2020). Structure of SWI/SNF chromatin

remodeller RSC bound to a nucleosome. *Nature* 579, 448–451. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2088-0>.

Walfridsson, J., Khorosjutina, O., Matikainen, P., Gustafsson, C.M., and Ekwall, K. (2007). A genome-wide role for CHD remodelling factors and Nap1 in nucleosome disassembly. *EMBO J* 26, 2868–2879. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601728>.

Walmacq, C., Kireeva, M.L., Irvin, J., Nedialkov, Y., Lubkowska, L., Malagon, F., Strathern, J.N., and Kashlev, M. (2009). Rpb9 subunit controls transcription fidelity by delaying NTP sequestration in RNA polymerase II. *J Biol Chem* 284, 19601–19612. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.006908>.

Wang, G., Balamotis, M.A., Stevens, J.L., Yamaguchi, Y., Handa, H., and Berk, A.J. (2005). Mediator requirement for both recruitment and postrecruitment steps in transcription initiation. *Mol Cell* 17, 683–694. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.010>.

Wang, K., Kan, J., Yuen, S.T., Shi, S.T., Chu, K.M., Law, S., Chan, T.L., Kan, Z., Chan, A.S.Y., Tsui, W.Y., et al. (2011). Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nat Genet* 43, 1219–1223. <https://doi.org/10.1038/ng.982>.

Wang, X., Sun, Q., Ding, Z., Ji, J., Wang, J., Kong, X., Yang, J., and Cai, G. (2014). Redefining the modular organization of the core Mediator complex. *Cell Research* 24, 796–808. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.64>.

Warfield, L., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2004). Positive and negative functions of the SAGA complex mediated through interaction of Spt8 with TBP and the N-terminal domain of TFIIA. *Genes Dev* 18, 1022–1034. <https://doi.org/10.1101/gad.1192204>.

Werner, F., and Grohmann, D. (2011). Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nat Rev Microbiol* 9, 85–98. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2507>.

West, S., Gromak, N., and Proudfoot, N.J. (2004). Human 5' → 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-

transcriptional cleavage sites. *Nature* 432, 522–525.
<https://doi.org/10.1038/nature03035>.

Whitehouse, I., Rando, O.J., Delrow, J., and Tsukiyama, T. (2007). Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription. *Nature* 450, 1031–1035.
<https://doi.org/10.1038/nature06391>.

Wilson, B.G., Wang, X., Shen, X., McKenna, E.S., Lemieux, M.E., Cho, Y.-J., Koellhoffer, E.C., Pomeroy, S.L., Orkin, S.H., and Roberts, C.W.M. (2010). Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. *Cancer Cell* 18, 316–328.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.09.006>.

Wu, Y., Reece, R.J., and Ptashne, M. (1996). Quantitation of putative activator-target affinities predicts transcriptional activating potentials. *EMBO J* 15, 3951–3963. .

Xue, Y., Canman, J.C., Lee, C.S., Nie, Z., Yang, D., Moreno, G.T., Young, M.K., Salmon, E.D., and Wang, W. (2000). The human SWI/SNF-B chromatin-remodeling complex is related to yeast Rsc and localizes at kinetochores of mitotic chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13015–13020. .

Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Okamoto, S., Mura, T., and Handa, H. (2006). P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell* 21, 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.024>.

Yan, L., and Chen, Z. (2020). A Unifying Mechanism of DNA Translocation Underlying Chromatin Remodeling. *Trends in Biochemical Sciences* 45, 217–227.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.09.002>.

Yang, F., DeBeaumont, R., Zhou, S., and Näär, A.M. (2004). The activator-recruited cofactor/Mediator coactivator subunit ARC92 is a functionally important target of the VP16 transcriptional activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 2339–2344.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0308676100>.

Yang, M., Hay, J., and Ruyechan, W.T. (2008). Varicella-Zoster Virus IE62 Protein Utilizes the Human Mediator Complex in Promoter Activation. *J Virol* 82, 12154–12163. <https://doi.org/10.1128/JVI.01693-08>.

Yarragudi, A., Miyake, T., Li, R., and Morse, R.H. (2004). Comparison of ABF1 and RAP1 in Chromatin Opening and Transactivator Potentiation in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 24, 9152–9164. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.20.9152-9164.2004>.

Yokomori, K., Zeidler, M.P., Chen, J.L., Verrijzer, C.P., Mlodzik, M., and Tjian, R. (1994). *Drosophila* TFIIA directs cooperative DNA binding with TBP and mediates transcriptional activation. *Genes Dev.* 8, 2313–2323. <https://doi.org/10.1101/gad.8.19.2313>.

Yoon, N.K., Maresh, E.L., Elshimali, Y., Li, A., Horvath, S., Seligson, D.B., Chia, D., and Goodglick, L. (2010). Elevated MED28 expression predicts poor outcome in women with breast cancer. *BMC Cancer* 10, 335. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-335>.

Yu, F., Imamura, Y., Ueno, M., Suzuki, S.W., Ohsumi, Y., Yukawa, M., and Tsuchiya, E. (2015). The yeast chromatin remodeler Rsc1-RSC complex is required for transcriptional activation of autophagy-related genes and inhibition of the TORC1 pathway in response to nitrogen starvation. *Biochem Biophys Res Commun* 464, 1248–1253. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.114>.

Yuan, J., Chen, K., Zhang, W., and Chen, Z. (2022). Structure of human chromatin-remodelling PBAF complex bound to a nucleosome. *Nature* 605, 166–171. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04658-5>.

Yudkovsky, N., Ranish, J.A., and Hahn, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 408, 225–229. <https://doi.org/10.1038/35041603>.

Zamudio, A.V., Dall’Agnese, A., Henninger, J.E., Manteiga, J.C., Afeyan, L.K., Hannett, N.M., Coffey, E.L., Li, C.H., Oksuz, O., Sabari, B.R., et al. (2019). Mediator Condensates Localize Signaling Factors to Key Cell Identity Genes. *Mol Cell* 76, 753–766.e6.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.016>.

Zanton, S.J., and Pugh, B.F. (2006). Full and partial genome-wide assembly and disassembly of the yeast transcription machinery in response to heat shock. *Genes Dev* 20, 2250–2265. <https://doi.org/10.1101/gad.1437506>.

Zhang, H., Roberts, D.N., and Cairns, B.R. (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* 123, 219–231. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.036>.

Zhang, H., Rigo, F., and Martinson, H.G. (2015a). Poly(A) Signal-Dependent Transcription Termination Occurs through a Conformational Change Mechanism that Does Not Require Cleavage at the Poly(A) Site. *Mol Cell* 59, 437–448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.008>.

Zhang, H., Wang, X., Li, J., Shi, R., and Ye, Y. (2021). BAF Complex in Embryonic Stem Cells and Early Embryonic Development. *Stem Cells Int* 2021, 6668866. <https://doi.org/10.1155/2021/6668866>.

Zhang, L., Maul, R.S., Rao, J., Apple, S., Seligson, D., Sartippour, M., Rubio, R., and Brooks, M.N. (2004). Expression Pattern of the Novel Gene EG-1 in Cancer. *Clinical Cancer Research* 10, 3504–3508. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0467>.

Zhang, Z., Boskovic, Z., Hussain, M.M., Hu, W., Inouye, C., Kim, H.-J., Abole, A.K., Doud, M.K., Lewis, T.A., Koehler, A.N., et al. (2015b). Chemical perturbation of an intrinsically disordered region of TFIID distinguishes two modes of transcription initiation. *Elife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.07777>.

Zhang, Z., English, B.P., Grimm, J.B., Kazane, S.A., Hu, W., Tsai, A., Inouye, C., You, C., Piehler, J., Schultz, P.G., et al. (2016). Rapid dynamics of general transcription factor TFIIB binding during preinitiation complex assembly revealed by single-molecule analysis. *Genes Dev* 30, 2106–2118. <https://doi.org/10.1101/gad.285395.116>.

Zhao, H., Young, N., Kalchschmidt, J., Lieberman, J., El Khattabi, L.,

Casellas, R., and Asturias, F.J. (2021). Structure of mammalian Mediator complex reveals Tail module architecture and interaction with a conserved core. *Nat Commun* 12, 1355. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21601-w>.

Zhu, X., Zhang, Y., Bjornsdottir, G., Liu, Z., Quan, A., Costanzo, M., Dávila López, M., Westholm, J.O., Ronne, H., Boone, C., et al. (2011). Histone modifications influence mediator interactions with chromatin. *Nucleic Acids Res* 39, 8342–8354. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr551>.

Zhu, Y., Qi, C., Jain, S., Le Beau, M.M., Espinosa, R., Atkins, G.B., Lazar, M.A., Yeldandi, A.V., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (1999). Amplification and overexpression of peroxisome proliferatoractivated receptor binding protein (PBP/PPARBP) gene in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10848–10853. .

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

Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer | *Nature*.

9 ANNEXE

9.1 REVUE

Voir page suivante.

Note à propos de ma contribution dans la rédaction de cet article de synthèse : J'ai rédigé cette revue avec Eliet Sipos et Julie Soutourina. J'ai notamment pris en charge la partie traitant des rôles du Médiateur en relation avec l'architecture de la chromatine.

Opinion

Mediator Roles Going Beyond Transcription

Kévin M. André,^{1,2} Eliet H. Sipos,^{1,2} and Julie Soutourina^{1,*}

Dysfunctions of nuclear processes including transcription and DNA repair lead to severe human diseases. Gaining an understanding of how these processes operate in the crowded context of chromatin can be particularly challenging. Mediator is a large multiprotein complex conserved in eukaryotes with a key coactivator role in the regulation of RNA polymerase (Pol) II transcription. Despite intensive studies, the molecular mechanisms underlying Mediator function remain to be fully understood. Novel findings have provided insights into the relationship between Mediator and chromatin architecture, revealed its role in connecting transcription with DNA repair and proposed an emerging mechanism of phase separation involving Mediator condensates. Recent developments in the field suggest multiple functions of Mediator going beyond transcriptional processes *per se* that would explain its involvement in various human pathologies.

A Multisubunit Complex to Mediate Transcription Regulation

In eukaryotic cells, all DNA-related processes including transcription and DNA repair occur in the crowded context of chromatin. The detailed understanding of these processes is particularly challenging, and their dysfunction constitutes the basis of many human pathologies.

The discovery of the Mediator complex nearly 30 years ago completely changed our vision of transcriptional regulation (reviewed in [1]). Mediator is a large multiprotein complex conserved in eukaryotes that plays an essential **coregulator** (see [Glossary](#)) role in RNA polymerase (Pol) II transcription. This complex is recruited to regulatory regions called **enhancers** in metazoans or upstream activating sequences (UASs) in yeast. It serves as a functional link between **specific transcription factors (TFs)** bound to these regions, and the basal transcriptional machinery at **core promoters**. Together with general transcription factors (GTFs), Mediator promotes the assembly of the **preinitiation complex (PIC)** including Pol II recruitment. It also stimulates the phosphorylation of the Pol II **C-terminal domain (CTD)** by the Kin28/CDK7 kinase subunit of transcription factor II H (TFIIH), one of the GTFs. Despite intensive studies, it remains to be deciphered how the complexity and multiple physical connections of Mediator contribute to its functions. Moreover, recent studies suggest that the spectrum of Mediator roles in eukaryotic cells could be wider than previously established. In this opinion article, we focus on three specific aspects of Mediator function in transcription-associated events, beyond its roles in transcriptional processes *per se*, that, in the view herein, would help to gain understanding of its involvement in diverse human pathologies [2,3] ([Box 1](#)). Novel findings on the involvement of Mediator in chromatin architecture, phase-separated condensate formation, and DNA repair are discussed.

Mediator and Chromatin Architecture

One of the key questions on the mechanism of Mediator function is related to chromatin context. The Mediator–chromatin interplay occurs at many levels, from nucleosomal organisation to 3D chromatin structure. Indeed, its coactivator function is linked to chromatin architecture at promoter regions and enhancer-promoter contacts. Moreover, Mediator binding to nucleosomes and its functional interactions with chromatin-acting complexes were previously reported [4–9].

Highlights

Mediator is a large multiprotein complex conserved in eukaryotes and is essential for transcription regulation. Recent advances suggest multiple functions of Mediator in transcription-associated events that go beyond transcriptional processes *per se*, that would help to understand the molecular mechanisms of its mode of action and its involvement in various human pathologies.

Mediator functions are related to chromatin architecture, from nucleosome occupancy and dynamics to enhancer-promoter contacts and genome organisation in chromatin domains.

Mediator forms phase-separated condensates on super-enhancers together with master transcription factors, other coactivators, RNA polymerase II, and signalling factors, supporting a model of phase separation as an emerging mechanism for nuclear functions.

Mediator serves as a link between transcription and nucleotide-excision DNA repair for recruitment of the repair machinery to transcribed regions.

¹Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France

²These authors contributed equally to this work

*Correspondence: julie.soutourina@cea.fr (J. Soutourina).

Box 1. Mediator and Diseases

Having key functions in the cell, Mediator is involved in a broad range of human diseases such as neurodevelopmental, cardiovascular, and behavioural disorders along with cancers [2,3]. Indeed, mutations in the MED12, MED13, and CDK8 genes that encode subunits of the Mediator kinase module are associated with neurodevelopmental disorders including X-linked mental retardation, developmental delay, and/or intellectual disability [63–68]. A mutation in MED17 leads to infantile cerebral atrophy [69] and a mutation in MED23 cosegregates with intellectual disability [70]. Some genes that encode Mediator subunits are considered as oncogenes, or tumour suppressors, or both. Whereas CDK8 is a colorectal cancer-specific oncogene, MED29 has both pro- and antitumoral functions in pancreatic cancer [71,72]. Consequently, targeting Mediator in this context can disturb the disease process: for example, in prostate cancer cells, inhibition of MED1 and MED17 through RNA interference blocked the proliferation of cancer cells and increased apoptosis [73]. Similarly, lentivirus-mediated inhibition of MED19 in breast cancer cells blocked the cell cycle and cell proliferation [74]. Knockdown of MED30 by siRNA in renal cell carcinoma resulted in a decrease in proliferation, migration, and invasion [75].

Cell identity genes along with oncogenes are under the control of super-enhancers (SEs) enriched for Mediator, specific transcription factors, and other coregulators. The inhibition of the BRD4 coactivator, a Mediator interactor, led to the preferential loss of both coregulators at SEs and impaired transcription of their associated genes [17]. Moreover, specific inhibition of Mediator kinases in cases of acute myeloid leukaemia led to the upregulation of SE-associated tumour suppressor genes and subsequent cell growth arrest [76].

Targeting Mediator interactions with specific transcription factors was proposed as a potential therapeutic treatment in fungal infections [77]. The pleiotropic drug resistance transcription factor (Pdr1) orthologues are key regulators of antifungal drug resistance in the human pathogen *Candida glabrata*. The inhibition of the Pdr1–Med15 interaction perturbed Pdr1-dependent gene activation, and sensitised yeasts to azole antifungals [77].

Although Mediator has been found to be involved in many pathologies and its targeting has been studied in diseased cells, its molecular pathophysiology is mostly unknown. With its multiple connections to nuclear components and key cell functions, one can foresee future therapeutic potential for the Mediator complex based on the accurate understanding of its dysregulation.

In eukaryotic cells, nucleosomes are structural components of chromatin. Their positioning, dynamics, and modifications, are thus integral to the regulation of nuclear processes. Their presence can hide specific DNA sequences and disturb the binding of different factors to DNA. Consequently, gene promoters contain **nucleosome-depleted regions (NDRs)** ensuring that DNA is accessible to proteins, including chromatin regulators and the transcriptional machinery [10]. The role of Mediator in PIC assembly was proposed to be related to chromatin architecture in terms of nucleosome occupancy and dynamics [1,11]. Indeed, a detailed analysis of the gene-specific effect of a mutation in the Med10 Mediator subunit on PIC formation in *Saccharomyces cerevisiae*, showed that the most strongly affected genes had a low nucleosome occupancy around the transcription start site (TSS) and dynamic first nucleosomes upstream and downstream from the NDR, so-called hot nucleosomes –1 and +1, with shorter residence time [1,11].

To transmit regulatory signals, Mediator is recruited to enhancers via direct interactions with specific TFs and then contacts the PIC components including Pol II at respective core promoters [1]. In metazoans, it was proposed that Mediator participates in chromatin looping between enhancers and core promoters through a physical interaction with cohesin [5,12]. In support of a model involving chromatin looping, in yeast, a single Mediator complex is known to bind to UASs and transiently contact core promoters [13,14]. A recent study shed new light on this question proposing that Mediator, together with Pol II, serves as a functional rather than just a physical bridge between enhancers and promoters, and that architectural proteins like cohesin are required to establish these enhancer-promoter contacts [15]. Indeed, the depletion of Mediator from mouse embryonic stem (mES) cells does not impair promoter–enhancer interactions, suggesting that neither Mediator nor Pol II alone are absolutely required for loop formation [15]. Moreover, Pol II inhibition that leads to full depletion of Mediator and Pol II from chromatin, has little or no effect on cohesin binding or promoter–enhancer interactions. By contrast, depletion of cohesin impairs these contacts [15]. These data challenge the previous model of a physical

Glossary

Chromosomal interacting domain (CID): genome-organising and self-associating domain identified by Micro-C in yeast with DNA sequences interacting with each other.

Coregulator: protein or multisubunit protein complex that interacts with specific transcription factors. Serves as a bridge to basal transcription machinery or acts on chromatin structure for transcription regulation. Mediator is one of these essential complexes.

Core promoter: DNA region for RNA polymerase recruitment and PIC assembly that is located close to the TSS and is sufficient to direct precise transcription initiation.

C-terminal domain (CTD): domain of the largest Pol II subunit containing multiple heptapeptide repeats. Phosphorylation and other post-translational modifications of this domain are important for different steps of the transcription cycle and for RNA processing.

Enhancer: regulatory region in metazoans bound by specific transcription factors and located at different distances from the core promoter. Transcription of enhancers produces noncoding enhancer RNAs that contribute to transcription regulation. In yeast, these regulatory regions are named UASs.

Intrinsically disordered region (IDR): protein region lacking a defined 3D structure and often containing repeated sequence elements, providing a basis for multivalent weak intermolecular interactions. IDR-containing proteins can phase separate under physiological conditions and are enriched in many biological condensates.

Micro-C approach: Hi-C-based method for 3D chromatin analysis with nucleosomal resolution, in which micrococcal nuclease is used instead of restriction enzymes to fragment chromatin.

Nucleosome-depleted region (NDR): DNA region in core promoters depleted for nucleosomes to ensure the accessibility of DNA to different proteins, including the transcription machinery.

Nucleotide excision repair (NER): evolutionarily conserved DNA repair pathway that removes bulky and/or helix-distorting DNA lesions, including pyrimidine dimer photoproducts induced by UV light (Box 2).

Mediator bridge between enhancers and promoters [15,16]. Interestingly, a model in which Mediator condensates on enhancers interact transiently with the transcription machinery at promoters would further question the definition of a physical chromatin contact, and suggest that an effective distance required for functional interactions between enhancers and promoters could be of the same order as the size of condensates and therefore larger than a direct contact distance (see the following section for discussion on **phase separation**).

Large clusters of enhancers called **super-enhancers (SEs)** involved in the regulation of cell identity gene and oncogene expression are particularly enriched for Mediator, chromatin-acting complexes, and specific TFs [17,18]. Physical and functional interactions between Mediator and chromatin-modifying complexes were proposed, providing further evidence for Mediator-chromatin interplay [1,4,8,19,20]. Recent work in mouse neural stem cells (NSCs) confirmed known physical interactions between Mediator and Ep300/CBP or cohesin, and led to the identification of novel contacts, including the chromatin modifiers Carn1 and Jmjd1c [8].

Next, Mediator has also been suggested to play a role in global chromatin structure. Short- and long-range interactions between nucleosomes contribute to the overall genome organisation. Not all genomic loci have the same level of compaction, and the genome is organised into self-associating domains named **chromosomal interacting domains (CIDs)** in yeast and **topologically associating domains (TADs)** in mammals [21–23]. In budding yeast, these domains encompass one to five genes whose compaction is anticorrelated with transcription rate and active epigenetic marks [22]. Using the Micro-C approach, changes in 3D-genome organisation at nucleosomal resolution were recently observed in a yeast deletion mutant for the Med1 Mediator subunit with a decompaction of most genes compared with the wild type [22]. The CIDs are separated by boundaries that are enriched for NDRs, transcription-related histone marks such as H3K4me3 and H3K18ac and correlate with promoter locations [22]. A recent analysis of yeast Mediator ChIP-Seq data showed that the majority of Mediator enrichment peaks overlapped with these boundaries, in particular with the strongest ones that are characterised by few or no interactions across the boundaries [4]. Moreover, the purification of chromatin-bound Mediator revealed its interactions with proteins involved in chromatin architecture regulation, such as chromatin remodelers and gene-looping factors including the **SWITCH/Sucrose Nonfermentable (SWI/SNF)** complex and Ssu72 [4].

In addition to being present at regulatory regions essential for gene transcription and engaged in interactions with transcription initiation factors, Mediator is bound to regulatory architectural regions and interacts with chromatin-modifying proteins. It could therefore participate in the establishment of subnuclear structures dedicated to transcription and related processes. Further work is needed to understand the exact molecular mechanisms involved in these key aspects of Mediator function [4–9,11,15,19,20,22]. Its own recruitment and dynamics are strongly related to chromatin organisation. Moreover, this complex might influence recruitment of chromatin-modifying and architectural proteins or their activity, thus shaping chromatin structure.

Mediator in Phase Separation

To understand how chromatin-related processes are organised within the nucleus, a model of protein condensates or membraneless compartments driven by phase separation has emerged. The capacity of Mediator to undergo phase separation makes it an active player in these mechanisms, as proposed for its activity at SEs (Figure 1) [24]. As SEs are large clusters of enhancers, they allow for the *in vivo* visualisation of the condensates that potentially also occur on classical enhancers. **Liquid–liquid phase separation**, a process of fluid phase formation, is thought to be driven by dynamic interactions involving proteins with **intrinsically disordered**

Phase separation or liquid–liquid

phase separation: local concentration and fluid phase formation driven by multivalent, cooperative, and dynamic macromolecular interactions.

Establishes biomolecular condensates or membraneless compartments, with dynamic internal re-organisation and rapid exchange kinetics. IDRs within the proteins are particularly involved in these interactions.

Preinitiation complex (PIC): protein complex assembled on core promoter for transcription initiation. It is composed of six GTFs (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIH, TFIIIE, and TFIIF), RNA polymerase II, and Mediator.

Specific transcription factor (TF): sequence-specific DNA-binding activator or repressor protein, essential for regulated transcription.

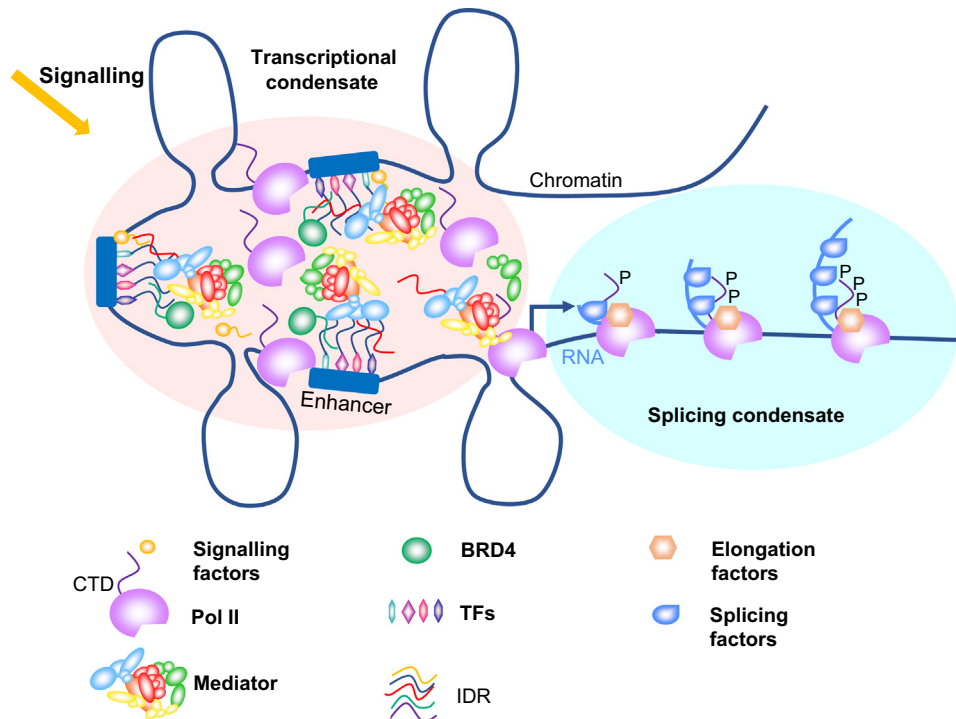
Super enhancer (SE): large cluster of enhancers highly occupied by Mediator, along with other coregulators and specific transcription factors. These enhancers are essential for transcriptional regulation of key cell identity genes and tumour oncogenes.

SWITCH/Sucrose Nonfermentable (SWI/SNF): ATP-dependent chromatin remodelling complex.

Topologically associating domain (TAD): genome-organisation domain identified by Hi-C in metazoans.

Characterised by a high frequency of interactions within a TAD, but with insulation between TADs. Architectural proteins, including CTCF and cohesin, are important for genome organisation in TADs.

Transcription-coupled repair (TCR): subpathway of NER, that removes DNA lesions on the transcribed strand that interfere with the progression of RNA polymerase II (Box 2).



Trends in Genetics

Figure 1. Mediator in Phase-Separated Condensates on Super-Enhancers. Nuclear condensates that are proposed to be driven, in part, by interactions of intrinsically disordered regions (IDRs) within proteins and rely on liquid-liquid phase separation, are schematised for transcription activation (in pink on the left) and splicing (in light blue-green on the right). Mediator forms condensates together with master transcription factors (TFs), the bromodomain-containing protein 4 (BRD4) coactivator (in dark green), and RNA polymerase II (Pol II) (in purple) at super-enhancers for regulation of key cell identity genes. Mediator is represented in modular organisation with subunits from the head module (in red), middle module (in yellow), tail module (in blue), and Med14 subunit linking these three main modules (in orange). The CDK8 kinase module (in green) dissociates from the complex when Mediator transiently contacts Pol II and general transcription factors (GTFs) (not shown) within the preinitiation complex (PIC) on core promoters. Signalling factors (in orange) from the WNT, transforming growth factor (TGF)- β , and Janus kinase (JAK)/STAT (signal transducer and activator of transcription) pathways that transmit extracellular stimuli to super-enhancers can concentrate in Mediator condensates. The C-terminal domain (CTD) of the largest Pol II subunit that contains an IDR is phosphorylated (P) by cyclin-dependent kinases for transition from transcription initiation to elongation. Pol II CTD phosphorylation can regulate the transition from transcription to splicing in the context of condensates formed by Pol II, transcription elongation factors (in light brown) associated with Pol II, and splicing factors (in blue) that interact with Pol II CTD and RNA (in blue).

regions (IDRs) [25]. Condensate formation in cells was assumed to rely on these phase separation phenomena that were initially observed *in vitro*.

Recent studies showed that Mediator, together with master TFs, the bromodomain-containing protein 4 (BRD4) coactivator, and Pol II, forms condensates through disordered protein regions in order to compartmentalise and concentrate transcriptional machinery for regulation of key cell identity genes in mammals [26–29]. Indeed, the MED1 Mediator subunit and the BRD4 coactivator were visualised in mES cells as discrete bodies at SEs, exhibiting features of biomolecular liquid-like condensates [29]. Moreover, the IDR domains of MED1 and BRD4 behave as phase-separated liquid droplets *in vitro* and this domain of MED1 is important for the formation of condensates in cells [29]. Different TFs including mammalian OCT4 and yeast GCN4 form condensates with Mediator through their activation domains (ADs), further emphasising the importance of phase separation mechanisms in Mediator action [26].

Mediator and Pol II clusters that have properties of phase-separated condensates were directly visualised in mES cells by live cell super-resolution imaging [27]. The majority of stable Mediator clusters colocalised with those of Pol II in living mES cells. Based on the analysis of one SE-controlled gene, a model has been proposed in which large Mediator clusters on enhancers can transiently interact with the transcription machinery at promoters, suggesting potential contacts with multiple promoters and raising the possibility of a larger distance requirement between enhancer and promoter elements [27].

Mediator condensates on SEs can encompass many different proteins including signalling factors that transmit extracellular stimuli to these enhancers [30]. Signalling factors of WNT, transforming growth factor (TGF)- β , and Janus kinase (JAK)/STAT (signal transducer and activator of transcription) pathways can enter and concentrate in Mediator condensates through their IDRs both *in vitro* and *in vivo*. In particular, the WNT coactivator β -catenin integrates into nuclear condensates in response to WNT pathway stimulation in living mES cells [30]. Moreover, selective occupancy of β -catenin on SEs depends on its IDR along with its condensate- and TF-interactions [30]. These results suggest that signalling factors can be incorporated into SE condensates established by Mediator and master TFs and that this mechanism contributes to the cell-type specificity of signalling.

Transcription is correlated with different nuclear processes, and RNA splicing represents one of the most well-known cotranscriptional events associated with nuclear condensates. Pol II phosphorylation was recently proposed to regulate the transition from transcription to splicing in the context of nuclear condensates, suggesting a functional link between different membraneless compartments of the nucleus [28]. Phosphorylation of the Pol II CTD influences its interactions with transcriptional and splicing machineries. Recent work has established that Pol II CTD containing an IDR contributes to its interaction with condensates formed by purified human Mediator or MED1-IDR *in vitro* [28]. At SE-driven active genes, splicing-factor condensates were observed in mES cells [28]. Analysis of hypo- or hyperphosphorylated forms of Pol II suggests a model in which Pol II CTD phosphorylation leads to its eviction from Mediator condensates, and contributes to formation of splicing-factor condensates at actively-transcribed genes associated with SEs [28]. Thus, these results suggest that phosphorylation could contribute to partitioning of Pol II between Mediator and splicing-factor condensates (Figure 1).

The most recent literature clearly illustrates the complexity and rapid development of the field. The links between transcription and other nuclear functions that involve phase-separation phenomena could be rather complex and unexpected, possibly including the mechanisms of chromatin organisation or the DNA damage response. For example, chromatin on its own can undergo liquid–liquid phase separation *in vitro* [31] and the synthesis of long noncoding RNAs from functional promoters, which are assembled on double-strand breaks, stimulates the formation of DNA-damage-response foci [32]. The capacity of Mediator to participate in multiple protein–protein interactions and undergo phase separation is believed to be related to the presence of disordered regions in many subunits of this complex [28,29,33–35]. The fact that the location of these regions is similar within Mediator subunits across different eukaryotes may reflect their importance for Mediator function in transcriptional regulation, and potentially even more broadly in chromatin-related processes. It should be noted that the capacity of Mediator to undergo phase separation was mainly analysed using the MED1 subunit that is dispensable in many mammalian cell lines [15], emphasising the importance of extending the work to different Mediator subunits.

Mediator in DNA Repair

Transcription influences genetic integrity by affecting DNA repair, replication, recombination, and mutagenesis. Particularly, in order to ensure a rapid removal of DNA damage from transcribed

regions, transcription is coupled with DNA repair. DNA lesions are deleterious for transcription as they impede Pol II progression and can lead to its arrest, affecting gene expression and thereby cell growth and survival [36–41]. Interestingly, recent findings propose that Mediator, in addition to its essential coactivator activity, links transcription with DNA repair. This novel role was proposed via physical and functional contact of Mediator with Rad2 endonuclease, the yeast homolog of human XPG protein involved in **nucleotide-excision repair (NER)** [42,43]. This interaction was later confirmed *in vitro* with human XPG and MED17 proteins [44]. Mediator was proposed to function in **transcription-coupled repair (TCR)**, one of the two NER subpathways (Box 2). The principal components of the TCR machinery are well known, but much is left to be understood on the coupling of transcription and DNA repair *in vivo*.

Two hypotheses were proposed for the physiological role of the physical interaction observed between Mediator and Rad2: Rad2 may be implicated in transcription through this interaction with Mediator and/or Mediator may play a role in DNA repair by loading Rad2 onto active genes [42]. No growth phenotypes, except UV sensitivity, or transcriptional effects were observed in the Rad2 deletion context suggesting that Rad2 does not play a major role in transcription in yeast. Conversely, genome-wide analysis revealed that Rad2 occupancy was highly correlated with that of Mediator on the UASs of Pol II-transcribed genes [42]. Importantly, specific point mutations in the Med17 Mediator subunit led to a reduced Rad2 occupancy on Pol II-transcribed genes, and a decreased Rad2-Mediator interaction. Moreover, these mutations led to UV sensitivity in a global genome repair (GGR)-deficient context where only the TCR pathway is active, suggesting the implication of this complex in TCR [42,43]. Synthetic genetic interactions between Mediator and TCR-related proteins (Rpb9 Pol II subunit or Rad26/CSB) further support a functional link between Mediator and the TCR pathway [43]. Furthermore, deletions of genes encoding the Med12, Med15, and Med2 Mediator subunits cause UV sensitivity [45], suggesting that Mediator may be involved in DNA repair beyond the functional role of its Med17 subunit.

The interplay between Mediator, Rad2, and Pol II has been investigated using yeast genetic and genomic approaches [43]. Notably, in a yeast genetic context, deficiency of Pol II phosphorylation led to Mediator stabilisation on core promoters [13,14,46,47]. Rad2 genome-wide occupancy underwent major changes, following that of Mediator, but decreased on transcribed regions together with Pol II. This work demonstrates that the loading of Rad2 on transcribed regions is strongly affected by changes in Mediator/Rad2/Pol II interfaces. Several mechanisms could be proposed for how Mediator may contribute to Rad2 recruitment to DNA. One of the interesting possibilities could be that the loading of Rad2 to transcribed regions is connected to its recruitment to UASs by Mediator, and this could involve transient Mediator-Pol II intermediates on core promoters (Figure 2). These findings suggest a role for Mediator in linking transcription to DNA repair through the recruitment of Rad2/XPG. The proposed model further supports the idea that Mediator recruited to regulatory regions may act remotely through its transient contacts with core promoters.

Future work will determine if other NER factors intervene in the functional dynamics between Mediator, Pol II, and Rad2/XPG, and more generally in linking Mediator to DNA repair. One of the best-known factors implicated in both transcription and NER is TFIIH [48]. Interestingly, both Mediator and Rad2/XPG are engaged in interactions with Pol II and TFIIH [49–59]. Moreover, a recent proteomic analysis in human cells identified several Mediator subunits in CSB (a TCR-specific protein) and Pol II interactomes upon UV irradiation [60]. The functional arrangement of these contacts within the TCR pathway remains to be investigated.

Box 2. Nucleotide Excision Repair Subpathways

Nucleotide excision repair (NER) is an evolutionarily conserved pathway that removes bulky base adducts, such as pyrimidine dimers induced by UV light, which induce severe helix distortion [38,39]. Two NER subpathways recognise the damages in different genomic conditions (Figure I; note that only selected NER components are shown): (i) global genome repair (GGR) removes DNA lesions from the entire genome, whereas (ii) transcription-coupled repair (TCR) works on lesions located on the transcribed strand thus, allowing Pol II to proceed through actively-transcribed genes [36–41].

The first step of NER is the recognition of the DNA lesion which is different in the two subpathways. In GGR, the lesion-induced DNA distortion triggers the recruitment of a specific protein complex. In TCR, Pol II, blocked by the lesion, serves as a trigger that initiates the assembly of the NER machinery. The CSB factor (and its yeast homolog Rad26) has been proposed to participate in the recognition of the lesion in TCR [78–80] and Rad26/CSB and the Rpb9 Pol II subunit appear to be essential for efficient TCR repair [81]. Once the damage is recognised, DNA is opened by TFIIH activities and made accessible to the NER machinery including replication protein A (RPA) and Rad14/XPA. Dual excision is performed on the 3' side by XPG (Rad2 in yeast) and by a dimer of XPF–ERCC1 (Rad1–Rad10) on the 5' side. Interestingly, *in vitro* experiments with purified human proteins show that XPG binds to CSB and enhances its binding to the DNA bubble. XPG could therefore have a nonenzymatic role in DNA damage recognition [54]. After DNA excision, DNA is re-synthesised by a specific DNA polymerase and ligated by a DNA ligase. Mediator has been proposed to be involved in TCR for Rad2/XPG recruitment in cooperation with Pol II [42,43].

NER is essential for DNA repair, and mutations in this pathway lead to severe diseases including Xeroderma pigmentosum (XP) and Cockayne syndrome (CS). Patients affected by these diseases present overlapping symptoms such as UV sensitivity. First, patients with XP suffer from hypersensitivity to sunlight, predisposition to skin cancer, and internal tumours associated with mutation accumulation [82]. XP patients possess mutations in genes involved in the GGR subpathway, or in genes whose proteins are common to both TCR and GGR. Second, patients with CS present UV sensitivity and developmental disorders [83,84]. CS patients have mutations in the genes specifically involved in TCR. It should be noted that mutations in the XPG gene lead to XP that is sometimes associated with CS.

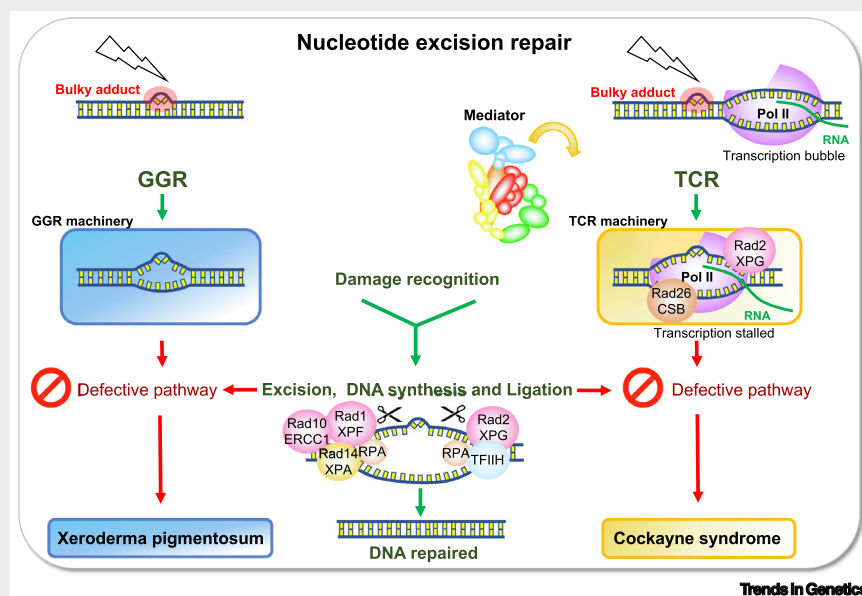
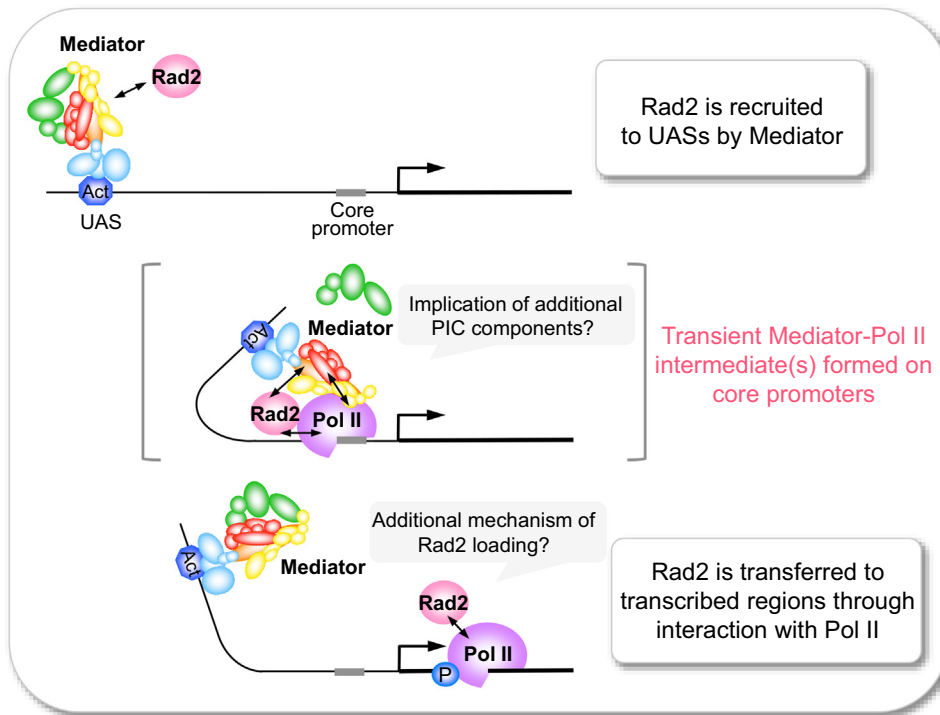


Figure I. Nucleotide Excision Repair Subpathways. Schematics represent the main steps of GGR and TCR subpathways including damage recognition, as well as excision, DNA synthesis and ligation. Human diseases associated with defective NER subpathways are indicated. Abbreviations: GGR, global genome repair; Pol II, RNA polymerase II; RPA, replication protein A; TCR, transcription-coupled repair; TFIIH, transcription factor II H (TFIIH).

Mediator could therefore act as an assembly platform or as a regulatory element beyond transcriptional processes *per se*, linking transcription and DNA repair. The complete orchestration of these contacts remains to be fully understood. The questions on how chromatin organisation and phase separation phenomena could contribute to the role of Mediator in DNA repair will also need to be addressed.



Trends in Genetics

Figure 2. Mediator in a Model for Rad2 DNA Repair Protein Recruitment to Pol II Transcribed Genes via Dynamic Mediator/Rad2/Pol II Interactions. Recent work shows that the functional interplay between Mediator and Pol II is involved in Rad2 loading on chromatin, and proposes that the presence of this DNA repair protein on transcribed regions could be linked to its recruitment to the UAS. In this model, Rad2 is first recruited to the UAS by Mediator and then transferred to transcribed regions through interactions with Pol II, and a transient Mediator/Pol II intermediate (s) (shown in brackets), formed at core promoters. Additional PIC components assembled at core promoters may influence Rad2 binding. Alternatively, Rad2 may be recruited to the UAS and transcribed regions through two independent events. Several mechanisms might coexist to explain Rad2 recruitment to transcribed regions. The colour code used is as follows: activator (Act) in blue; Rad2 in pink; and Pol II in purple. Mediator subunits are coloured in light blue/red/orange/yellow/green as in Figure 1, according to the modules. The dissociation of the CDK8 kinase module (in green), when Mediator transiently contacts Pol II and GTFs (not shown) within the PIC on core promoters is indicated. Double-headed arrows show interactions between Mediator, Rad2, and Pol II. Abbreviations: GTF, general transcription factor; PIC, preinitiation complex; Pol II, RNA polymerase II; UAS, upstream activating sequences.

Concluding Remarks

Many years of Mediator studies significantly improved our understanding of the essential functions of this complex in transcription regulation. With its complicated subunit composition, modular organisation, and multiple connections to different components of the nucleus, Mediator represents a key source of interesting and unexpected findings. Recent advances in elucidating the molecular mechanisms of Mediator action led to a significant expansion of our knowledge of its functions in transcriptional regulation and transcription-coupled events, suggesting more novel findings to come.

Mediator might be considered as one of the ‘integrating platforms’ of the nucleus. With its extraordinary structural flexibility and interacting capacities, this complex may be more generally involved in chromatin and nuclear organisation. Many aspects remain to be addressed in order to provide a complete picture of Mediator action within different levels of chromatin architecture, from nucleosomal distribution and dynamics to short- and long-range chromatin interactions [4,8,11,15,22] (see Outstanding Questions). As it is recruited to regulatory regions, Mediator

Outstanding Questions

How does Mediator act within different levels of chromatin architecture and organisation, from nucleosomal distribution and dynamics to short- and long-range chromatin interactions? Are there any differences in the link between Mediator and chromatin for compact or large eukaryotic genomes?

How applicable is the SE-based model for phase-separated, Mediator-containing condensates for classical enhancers? What are the developments in imaging technologies that may improve the visualisation of phase separation phenomena?

How can one Mediator complex be involved in multiple functions? How does partitioning between several functions occur? What is the regulatory mechanism of this partitioning?

What are the detailed molecular mechanisms of Mediator’s implication in DNA repair? How are these mechanisms linked to transcription?

How did different Mediator functions emerge during eukaryotic evolution? How did the multisubunit organisation of the complex emerge? Is the coactivator function of Mediator its primary activity?

How can we determine the precise molecular bases of the roles of Mediator in human diseases? How can we develop the therapeutic potential of Mediator subunits or interaction interfaces with nuclear components?

can act from a distance on other chromatin regions, with its role in DNA repair also possibly relying on its transient contacts with core promoters [43]. Moreover, phase separation mechanisms would suggest that the effective distance required for functional interactions between regulatory and core promoter regions could be larger than the direct contact distance. This model of phase separation as an emerging mechanism for nuclear functions is certainly a significant milestone in our understanding of Mediator function. It remains to be shown if these phenomena observed for Mediator and its partners on SEs [24,26–30] could be extended to classical enhancers. Since Pol II was found to be partitioned between transcriptional and splicing condensates, Mediator could localise to different membraneless compartments via protein interactions with its partners and participate in various nuclear processes.

The mechanisms by which Mediator acts in transcriptional regulation might also be important for its broader roles in eukaryotic cells. It may be involved in a number of processes including RNA metabolism or DNA repair, that occur cotranscriptionally or are connected with transcription serving as an assembly platform or as a regulatory element. In this regard, interesting findings have identified connections between Mediator and the nuclear pore complex that contributes to mRNA export or transcriptional memory mechanisms [1,61,62]. Future studies should elucidate the molecular mechanisms of Mediator's role in DNA repair as a link between transcription and NER [42,43], and their potential expansion to different DNA repair components and pathways. These findings also raise an important question as to how a single Mediator complex could share its activities between various nuclear processes and how all of these functions may be coordinated.

Given the central role of Mediator in cell physiology, many subunits of this complex have been implicated in human diseases including cancers and neurodevelopmental diseases (Box 1). In many cases, the precise mechanisms involving Mediator and biological events in transcription, and beyond, remain to be uncovered. Moreover, novel aspects of Mediator function will help in the understanding of pathologies, in which the involvement of this complex was not previously suspected, such as in chromatin or DNA repair-related disorders. The fundamental biological questions raised by Mediator studies are highly relevant to human diseases and will potentially lead to innovative therapeutic strategies.

Acknowledgements

We apologise to authors whose work could not be cited in this review because of the space limitations. We thank C. Mann and P.-Y. J. Wu for critical reading of the manuscript. The work of the J.S. laboratory was funded by the Agence Nationale de la Recherche, France (ANR-14-CE10-0012-01), and the Fondation ARC, France (PGA1 RF20170205342). K.A. is supported by a PhD training contact from the French Ministry of Higher Education and Research. E.S. is supported by a PhD training contract from the French Alternative Energies and Atomic Energy Commission (CEA).

References

1. Soutourina, J. (2018) Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 262–274
2. Schiano, C. *et al.* (2014) Involvement of Mediator complex in malignancy. *Biochim. Biophys. Acta* 1845, 66–83
3. Spaeth, J.M. *et al.* (2011) Mediator and human disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 776–787
4. Chereji, R.V. *et al.* (2017) Mediator binds to boundaries of chromosomal interaction domains and to proteins involved in DNA looping, RNA metabolism, chromatin remodeling, and actin assembly. *Nucleic Acids Res.* 45, 8806–8821
5. Kagey, M.H. *et al.* (2010) Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467, 430–435
6. Liu, Z. and Myers, L.C. (2012) Med5(Nut1) and Med17(Srb4) are direct targets of mediator histone H4 tail interactions. *PLoS One* 7, e38416
7. Lorch, Y. *et al.* (2000) Mediator-nucleosome interaction. *Mol. Cell* 6, 197–201
8. Quevedo, M. *et al.* (2019) Mediator complex interaction partners organize the transcriptional network that defines neural stem cells. *Nat. Commun.* 10, 2669
9. Zhu, X. *et al.* (2011) Histone modifications influence mediator interactions with chromatin. *Nucleic Acids Res.* 39, 8342–8354
10. Lai, W.K.M. and Pugh, B.F. (2017) Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 548–562
11. Eyche, T. *et al.* (2016) Functional interplay between Mediator and TFIIB in preinitiation complex assembly in relation to promoter architecture. *Genes Dev.* 30, 2119–2132
12. Lai, F. *et al.* (2013) Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription. *Nature* 494, 497–501

13. Jeronimo, C. *et al.* (2016) Tail and kinase modules differently regulate core mediator recruitment and function *in vivo*. *Mol. Cell* 64, 455–466
14. Petrenko, N. *et al.* (2016) Mediator undergoes a compositional change during transcriptional activation. *Mol. Cell* 64, 443–454
15. El Khattabi, L. *et al.* (2019) A pliable Mediator acts as a functional rather than an architectural bridge between promoters and enhancers. *Cell* 178, 1145–1158.e20
16. Soutourina, J. (2019) Mammalian Mediator as a functional link between enhancers and promoters. *Cell* 178, 1036–1038
17. Loven, J. *et al.* (2013) Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* 153, 320–334
18. Whyte, W.A. *et al.* (2013) Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* 153, 307–319
19. Malik, S. and Roeder, R.G. (2010) The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 761–772
20. Poss, Z.C. *et al.* (2013) The Mediator complex and transcription regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48, 575–608
21. Dixon, J.R. *et al.* (2012) Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485, 376–380
22. Hsieh, T.H. *et al.* (2015) Mapping nucleosome resolution chromosome folding in yeast by Micro-C. *Cell* 162, 108–119
23. Nora, E.P. *et al.* (2012) Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature* 485, 381–385
24. Hnisz, D. *et al.* (2017) A phase separation model for transcriptional control. *Cell* 169, 13–23
25. Banani, S.F. *et al.* (2017) Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 285–298
26. Boija, A. *et al.* (2018) Transcription factors activate genes through the phase-separation capacity of their activation domains. *Cell* 175, 1842–1855.e16
27. Cho, W.K. *et al.* (2018) Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates. *Science* 361, 412–415
28. Guo, Y.E. *et al.* (2019) Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates. *Nature* 572, 543–548
29. Sabari, B.R. *et al.* (2018) Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* 361, eaar3958
30. Zamudio, A.V. *et al.* (2019) Mediator condensates localize signaling factors to key cell identity genes. *Mol. Cell* 76, 753–766.e6
31. Gibson, B.A. *et al.* (2019) Organization of chromatin by intrinsic and regulated phase separation. *Nat. Cell Biol.* 21, 1286–1299
32. Pessina, F. *et al.* (2019) Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors. *Nat. Cell Biol.* 21, 1286–1299
33. Nagulapalli, M. *et al.* (2016) Evolution of disorder in Mediator complex and its functional relevance. *Nucleic Acids Res.* 44, 1591–1612
34. Sieracki, E. (2020) The Mediator complex and the role of protein-protein interactions in the gene regulation machinery. *Semin. Cell Dev. Biol.* 99, 20–30
35. Toth-Petroczy, A. *et al.* (2008) Malleable machines in transcription regulation: the mediator complex. *PLoS Comput. Biol.* 4, e1000243
36. Foustier, M. and Mullenders, L.H. (2008) Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* 18, 73–84
37. Hanawalt, P.C. and Spivak, G. (2008) Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 958–970
38. Lagerwerf, S. *et al.* (2011) DNA damage response and transcription. *DNA Repair (Amst)* 10, 743–750
39. Marteijn, J.A. *et al.* (2014) Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 465–481
40. Mullenders, L. (2015) DNA damage mediated transcription arrest: Step back to go forward. *DNA Repair (Amst)* 36, 28–35
41. Svestrup, J.Q. (2007) Contending with transcriptional arrest during RNAPII transcript elongation. *Trends Biochem. Sci.* 32, 165–171
42. Eyboullet, F. *et al.* (2013) Mediator links transcription and DNA repair by facilitating Rad2/XPG recruitment. *Genes Dev.* 27, 2549–2562
43. Georges, A. *et al.* (2019) Functional interplay between Mediator and RNA polymerase II in Rad2/XPG loading to the chromatin. *Nucleic Acids Res.* 47, 8988–9004
44. Kikuchi, Y. *et al.* (2015) Human mediator MED17 subunit plays essential roles in gene regulation by associating with the transcription and DNA repair machineries. *Genes Cells* 20, 191–202
45. Gaillard, H. *et al.* (2009) Genome-wide analysis of factors affecting transcription elongation and DNA repair: a new role for PAF and Ccr4-not in transcription-coupled repair. *PLoS Genet.* 5, e1000364
46. Jeronimo, C. and Robert, F. (2014) Kin28 regulates the transient association of Mediator with core promoters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 449–455
47. Wong, K.H. *et al.* (2014) TFIIF phosphorylation of the Pol II CTD stimulates Mediator dissociation from the preinitiation complex and promoter escape. *Mol. Cell* 54, 601–612
48. Compe, E. and Egly, J.M. (2012) TFIIF: when transcription met DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 343–354
49. Esnault, C. *et al.* (2008) Mediator-dependent recruitment of TFIIF modules in preinitiation complex. *Mol. Cell* 31, 337–346
50. Habraken, Y. *et al.* (1996) Transcription factor TFIIF and DNA endonuclease Rad2 constitute yeast nucleotide excision repair factor 3: implications for nucleotide excision repair and Cockayne syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 10718–10722
51. Ito, S. *et al.* (2007) XPG stabilizes TFIIF, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol. Cell* 26, 231–243
52. Koleske, A.J. and Young, R.A. (1994) An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368, 466–469
53. Nonet, M.L. and Young, R.A. (1989) Intragenic and extragenic suppressors of mutations in the heptapeptide repeat domain of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II. *Genetics* 123, 715–724
54. Sarker, A.H. *et al.* (2005) Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIF: insights for transcription-coupled repair and Cockayne syndrome. *Mol. Cell* 20, 187–198
55. Soutourina, J. *et al.* (2011) Direct interaction of RNA polymerase II and mediator required for transcription *in vivo*. *Science* 331, 1451–1454
56. Thompson, C.M. *et al.* (1993) A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell* 73, 1361–1375
57. Iyer, N. *et al.* (1996) Interactions involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIF, the nucleotide excision repair protein XPG, and Cockayne syndrome group B (CSB) protein. *Biochemistry* 35, 2157–2167
58. Bardwell, A.J. *et al.* (1994) Yeast nucleotide excision repair proteins Rad2 and Rad4 interact with RNA polymerase II basal transcription factor b (TFIIF). *Mol. Cell Biol.* 14, 3569–3576
59. Kim, Y.J. *et al.* (1994) A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA-Polymerase-II. *Cell* 77, 599–608
60. Boeig, S. *et al.* (2016) Multiomic analysis of the UV-induced DNA damage response. *Cell Rep.* 15, 1597–1610
61. D'Urso, A. *et al.* (2016) Set1/COMPASS and Mediator are repurposed to promote epigenetic transcriptional memory. *eLife* 5, e16691
62. Schneider, M. *et al.* (2015) The nuclear pore-associated TREX-2 complex employs Mediator to regulate gene expression. *Cell* 162, 1016–1028
63. Calpena, E. *et al.* (2019) *De novo* missense substitutions in the gene encoding CDK8, a regulator of the Mediator complex, cause a syndromic developmental disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 104, 709–720
64. Graham Jr., J.M. and Schwartz, C.E. (2013) MED12 related disorders. *Am. J. Med. Genet. A* 161A, 2734–2740
65. Nizon, M. *et al.* (2019) Variants in MED12L, encoding a subunit of the mediator kinase module, are responsible for intellectual disability associated with transcriptional defect. *Genet. Med.* 21, 2713–2722

66. Rishg, H. *et al.* (2007) A recurrent mutation in MED12 leading to R961W causes Opitz-Kaveggia syndrome. *Nat. Genet.* 39, 451–453
67. Schwartz, C.E. *et al.* (2007) The original Lujan syndrome family has a novel missense mutation (p. N1007S) in the MED12 gene. *J. Med. Genet.* 44, 472–477
68. Snijders Blok, L. *et al.* (2018) *De novo* mutations in MED13, a component of the Mediator complex, are associated with a novel neurodevelopmental disorder. *Hum. Genet.* 137, 375–388
69. Kaufmann, R. *et al.* (2010) Infantile cerebral and cerebellar atrophy is associated with a mutation in the MED17 subunit of the transcription preinitiation mediator complex. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 667–670
70. Hashimoto, S. *et al.* (2011) MED23 mutation links intellectual disability to dysregulation of immediate early gene expression. *Science* 333, 1161–1163
71. Firestein, R. *et al.* (2008) CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature* 455, 547–551
72. Kuuselo, R. *et al.* (2011) MED29, a component of the mediator complex, possesses both oncogenic and tumor suppressive characteristics in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 129, 2553–2565
73. Vijayvargia, R. *et al.* (2007) A coregulatory role for the mediator complex in prostate cancer cell proliferation and gene expression. *Cancer Res.* 67, 4034–4041
74. Li, L.H. *et al.* (2011) Lentivirus-mediated inhibition of Med19 suppresses growth of breast cancer cells *in vitro*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68, 207–215
75. Syring, I. *et al.* (2018) The knockdown of the mediator complex subunit MED30 suppresses the proliferation and migration of renal cell carcinoma cells. *Ann. Diagn. Pathol.* 34, 18–26
76. Pelish, H.E. *et al.* (2015) Mediator kinase inhibition further activates super-enhancer-associated genes in AML. *Nature* 526, 273–276
77. Nishikawa, J.L. *et al.* (2016) Inhibiting fungal multidrug resistance by disrupting an activator-Mediator interaction. *Nature* 530, 485–489
78. Li, W. *et al.* (2014) Transcription bypass of DNA lesions enhances cell survival but attenuates transcription coupled DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 42, 13242–13253
79. Tatum, D. *et al.* (2011) Diverse roles of RNA polymerase II-associated factor 1 complex in different subpathways of nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 286, 30304–30313
80. Verhage, R.A. *et al.* (1996) Double mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with alterations in global genome and transcription-coupled repair. *Mol. Cell. Biol.* 16, 496–502
81. Li, S. and Smerdon, M.J. (2002) Rpb4 and Rpb9 mediate subpathways of transcription-coupled DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 21, 5921–5929
82. Menck, C.F. and Munford, V. (2014) DNA repair diseases: what do they tell us about cancer and aging? *Genet. Mol. Biol.* 37, 220–233
83. Bukowska, B. and Karwowski, B.T. (2018) Actual state of knowledge in the field of diseases related with defective nucleotide excision repair. *Life Sci.* 195, 6–18
84. Cleaver, J.E. *et al.* (2009) Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat. Rev. Genet.* 10, 756–768